

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

**Eco-fisiología, estado sanitario y caracterización morfológica
y genética de las poblaciones de corzo (*Capreolus capreolus* L.)
en el P.N. de la Sierra de Guadarrama y zonas de influencia
(centro de la Península Ibérica)**



Fernando Horcajada Sánchez

**TESIS DOCTORAL
2015**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

Eco-fisiología, estado sanitario y caracterización morfológica y genética de las poblaciones de corzo en el P.N. de la Sierra de Guadarrama y zonas de influencia (centro de la Península Ibérica)

Memoria presentada por **Fernando Horcajada Sánchez** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid

Bajo la dirección de la **Dra. Isabel Barja Núñez**, Profesora del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid

El doctorando

VºBº de la Directora

Fernando Horcajada Sánchez

Dra. Isabel Barja Núñez

Madrid, octubre de 2015

ÍNDICE

ÍNDICE	5
Agradecimientos	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Antecedentes históricos.....	3
Características generales de la especie.....	5
Distribución y abundancia.....	10
Filogenia.....	13
Estado sanitario de las poblaciones.....	18
Los glucocorticoides fecales como indicadores de estrés fisiológico.....	19
ÁREA GENERAL DE ESTUDIO.....	25
Flora y fauna asociadas al área de estudio.....	28
La ganadería.....	35
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	39
Justificación.....	39
Objetivos.....	41
1. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DOS TÉCNICAS DE MUESTREO DE DISTANCIAS PARA LA ESTIMA DE LAS DENSIDADES DE CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA.....	47
Resumen	47
1.1. Introducción.....	48
1.2. Material y métodos	51
1.2.1. Ámbito de estudio.....	51
1.2.2. Muestreos de distancia a pie y en coche.....	52
1.2.3. Análisis de datos	54
1.3. Resultados	56
1.3.1. Muestreo general usando la post-estratificación “post-stratification”	56
1.3.2. Muestreo de distancias en coche “car line-transect”	56
1.3.3. Muestreo de distancias a pie “walk line-transect”	57
1.3.4. Comparación de las dos técnicas de muestreo.....	57
1.4. Discusión.....	58
2. ECOTIPOS LOCALES DE CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, DIMORFISMO SEXUAL Y COLORACIÓN.....	65
Resumen	65
2.1. Introducción.....	66
2.2. Material y métodos	68
2.2.1. Ámbito de estudio.....	68
2.2.2. Morfología y coloración.....	69
2.2.3. Determinación de la edad.....	71
2.2.4. Análisis estadístico de los datos.....	72
2.3. Resultados	73

2.3.1.	Crecimiento ponderal, corporal y dimorfismo sexual	73
2.3.2.	Diferencias en la coloración del pelaje	75
2.4.	Discusión.....	78

3. FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA: COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES ESPAÑOLAS Y EUROPEAS 85

Resumen	85
3.1. Introducción.....	86
3.2. Material y métodos	88
3.2.1. Ámbito de estudio.....	88
3.2.2. Conservación de las muestras y extracción del ADN	89
3.2.3. Amplificación y análisis del ADN mitocondrial	90
3.2.4. Amplificación y análisis de los marcadores microsatélites	92
3.2.5. Análisis de los datos	94
3.3. Resultados	95
3.3.1. Análisis del ADN mitocondrial.....	95
3.3.2. Análisis estándar de variabilidad genética con marcadores microsatélites.....	103
3.3.3. Análisis de la estructura genética con marcadores microsatélites.....	104
3.4. Discusión.....	105

4. CARGA PARASITARIA Y SEROPREVALENCIA EN EL CORZO EN DOS AMBIENTES DE MONTAÑA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA: INFLUENCIA DE LA COEXISTENCIA CON EL GANADO, EL HÁBITAT Y LA DENSIDAD 113

Resumen	113
4.1. Introducción.....	114
4.2. Material y métodos	117
4.2.1. Ámbito de estudio.....	117
4.2.2. Obtención y conservación de las muestras fecales y suero	118
4.2.3. Análisis de la carga parasitaria en muestras fecales.....	119
4.2.4. Análisis serológico	120
4.2.5. Estimación de la densidad de corzos.....	121
4.2.6. Análisis estadísticos.....	121
4.3. Resultados	122
4.3.1. Carga parasitaria	123
4.3.2. Análisis serológicos	125
4.4. Discusión.....	126

5. EFECTO DEL HÁBITAT, GANADERÍA EXTENSIVA, CAZA Y CARGA PARASITARIA SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS FISIOLÓGICO EN UNA POBLACIÓN DE CORZOS EN LA SIERRA DE GUADARRAMA 135

Resumen	135
5.1. Introducción.....	135
5.2. Material y métodos	138
5.2.1. Ámbito de estudio.....	138
5.2.2. Obtención y conservación de las muestras fecales	139
5.2.3. Extracción de glucocorticoides e inmunoensayo enzimático.....	142
5.2.4. Análisis coprológicos	142
5.2.5. Análisis estadísticos.....	143
5.3. Resultados	143
5.4. Discusión.....	145

CONCLUSIONES GENERALES 151

BIBLIOGRAFÍA..... 157

ANEXO 191

Agradecimientos

La presente Tesis Doctoral se ha realizado gracias a diferentes proyectos de gestión e investigación en tres espacios naturales de la Comunidad de Madrid, el Parque Natural de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara, la Reserva Regional de Caza de Sonsaz y el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Todos ellos, han sido financiados por la Comunidad de Madrid, a través de la Dirección General de Medio Ambiente de la Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, desde el año 1997 hasta la actualidad.

Requiere una especial mención en este apartado la figura de D. Juan A. Vielva, Director-Conservador del Parque Natural de Peñalara y actual Director del Centro de Investigación, Seguimiento y Evaluación del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama, como precursor del seguimiento continuado de las poblaciones de corzo en la Sierra de Guadarrama y por impulsar la investigación aplicada como base del conocimiento y la gestión de los Espacios Protegidos.

Quisiera agradecer también especialmente a D. José Ignacio Herce, Director de la Reserva Regional de Caza de Sonsaz, por su especial sensibilidad y por su interés en aplicar los proyectos de investigación llevados a cabo en el Parque Natural de Peñalara al ámbito de gestión de la Reserva Regional.

No puedo dejar de destacar igualmente, la labor del Cuerpo de Agentes Forestales de la Comunidad de Madrid, sin cuya colaboración, muchas veces por encima de sus obligaciones, no hubiera sido posible el desarrollo de esta Tesis.

Además, es necesario mencionar también a todos los técnicos e investigadores que de forma directa o indirecta han contribuido en la realización del presente estudio y de manera especial:

Al Dr. Paulino Fandos, por su ayuda inestimable y por todo el tiempo que me dedicó desinteresadamente durante los primeros años de este proyecto. A la Dra. Annie Machordom del Museo Nacional de Ciencias Naturales del CSIC, responsable del

Laboratorio de Sistemática Molecular y Genética de Poblaciones y a su equipo, la Dra. Lourdes Alcaraz y la Dra. María José Ruiz, por el desarrollo de los análisis genéticos. Al Dr. Emmanuel Serrano de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén y al Dr. Carlos Rodríguez-Vigal y Dña. María del Carmen López, del Laboratorio de Zoología Aplicada del Centro de Quintos de Mora del Organismo Autónomo de Parques Nacionales, por la realización de los cortes de incisivos y su interpretación. A la Dra. Gema Escribano-Ávila, al Dr. Carlos Lara-Romero y al Dr. Emilio Virgós, del Área de Biodiversidad y Conservación de la Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología de la Universidad Rey Juan Carlos, por el desarrollo de los análisis de los glucocorticoides fecales de las muestras de esta tesis. Al Dr. Christian Gortázar y a la Dra. Mariana Boadella del IREC (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos)-CSIC-Universidad de Castilla-La Mancha, por el desarrollo de los análisis sanitarios.

A los biólogos Rodrigo Fernández-Mellado y Gonzalo Castillo, por su colaboración en los censos nocturnos de corzo y a M. Ángeles Román y Mónica Jover, por sus comentarios y ayuda.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento más sincero a mi Directora de Tesis, la Dra. Isabel Barja por confiar en este proyecto y por ofrecerme todas las facilidades para poder llevar a cabo esta tesis, por su predisposición para ayudarme en todo momento y por sus inestimables correcciones y opiniones.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes históricos

Durante siglos, las montañas mediterráneas como la Sierra de Guadarrama han servido de refugio a numerosas especies de vertebrados frente al acoso del hombre que las ha eliminado de enclaves más llanos y accesibles (Tellería, 1999). Así, las poblaciones de corzo (*Capreolus capreolus* L.) son un fiel reflejo de esta situación. La Sierra de Guadarrama ha albergado áreas óptimas para la especie en épocas pasadas, manteniendo poblaciones estables de forma continua y propiciando además el proceso de recolonización que ha llevado al corzo a ocupar en las últimas décadas zonas de piedemonte y de campiña muy alejadas de sus territorios habituales en la Comunidad de Madrid.

En la Sierra de Guadarrama existen referencias de la especie desde el Pleistoceno Medio, tal y como atestiguan los numerosos restos del yacimiento de Pinilla del Valle (Buitrago, 1992). El corzo convivía por esa época con rebecos (*Rupicapra rupicapra*), cabras monteses (*Capra pyrenaica*), ciervos (*Cervus elaphus*) e incluso con grandes carnívoros como lobos (*Canis lupus*), hienas (*Crocuta spelea*) y leopardos (*Panthera* sp.) que desaparecieron en su mayoría por la acción directa del hombre (Alfárez et al., 1982). Además, durante esta época y al igual que ocurrió en otras áreas de montaña del Sur de Europa (Gliozzi et al., 1997; Hufthammer y Aaris-Sørensen, 1998), la Sierra de Guadarrama sirvió de refugio durante las últimas glaciaciones del Cuaternario a diferentes poblaciones europeas de corzo (Fig. 1).

En el conjunto de la especie, el registro fósil en el Pleistoceno indica que la distribución del género *Capreolus* se asemeja bastante a la actual, ocupando todo el centro y oeste de Europa, incluyendo territorios insulares como Gran Bretaña o Sicilia. En este aspecto cabe destacar que la colonización de las islas del continente no fue exitosa en la mayoría de ellas, no llegando a ocupar nunca Irlanda, Córcega ni Cerdeña (Danilkin, 1996).

En épocas históricas existen referencias en las que se produjeron grandes fluctuaciones en el continente, como en el siglo XVIII, durante el cual las poblaciones de corzo del oeste de Europa experimentaron una disminución considerable en sus poblaciones debido a la deforestación, la ganadería y la caza intensiva. La presencia de la especie en muchas zonas decreció con la intensificación de las actividades económicas humanas, especialmente con la aparición de armas de gran calibre. La distribución en Gran Bretaña, por ejemplo, fue relegada a poblaciones remanentes, en torno a una centena de ejemplares, en las Tierras Altas de Escocia (Whitehead, 1964).

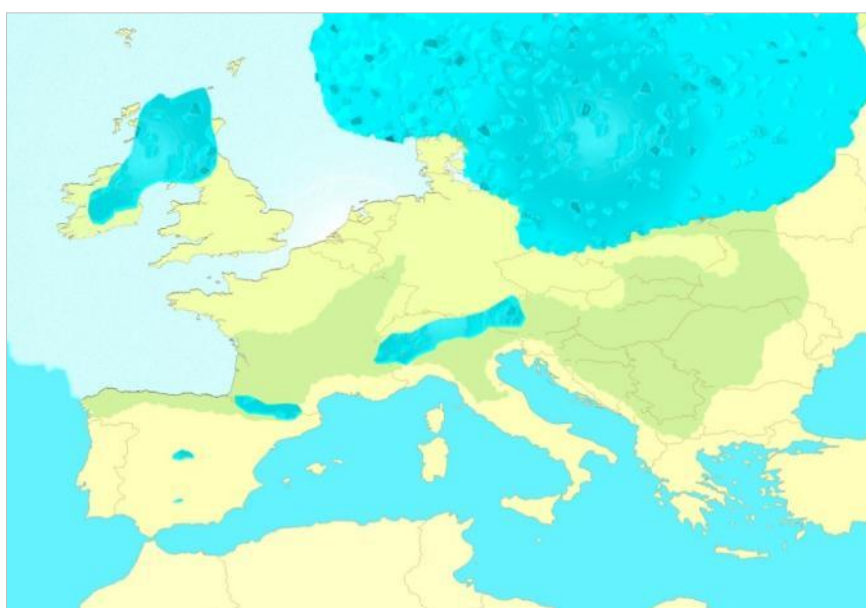


Figura 1. Europa durante las últimas glaciaciones del Pleistoceno (15000 a.C.). En verde oscuro se indica la zona forestal (modificado de Andersen y Borns, 1994).

En la Península Ibérica, Madoz (1845) menciona la presencia de corzo en su “Diccionario geográfico-estadístico-histórico de España y sus posesiones de ultramar” en multitud de localidades, haciendo referencia a las poblaciones cercanas a las del presente estudio, en la Sierra de Somosierra. Posteriormente, a principios del siglo XX, el zoólogo Ángel Cabrera es el primer investigador en ocuparse de la situación de la especie en España. La describe como un cérvido de pequeño tamaño, con pelaje leonado en verano y gris-parduzco en invierno, que carece de manchas blanquecinas en la cara inferior del cuello, distribuyéndose en todos los distritos zoológicos de la Península Ibérica, colonizando todos aquellos ecosistemas que le son favorables,

preferentemente a su entender “zonas montañosas cubiertas de abundante vegetación, sobre todo los grandes pinares con mucha jara” (Cabrera, 1914).

Como en otras regiones europeas, las formas ibéricas también recibieron nombres subespecíficos. Miller (1910) describió una subespecie de corzo en el Sistema Ibérico, en la provincia de Burgos, a la que denominó *Capreolus capreolus canus* y que fue aceptada por la comunidad científica del momento, en la que se incluirían las poblaciones de la Sierra de Guadarrama (Miller, 1912).

A mediados del siglo XX existen algunas referencias del declive del corzo en España (Conde de Yebes, 1943; Servicio de Pesca Continental, Caza y Parques Nacionales, 1968), en las que se describe la considerable reducción de las poblaciones, que se mantienen estables únicamente en núcleos de la Cordillera Cantábrica, Sistema Central y Sierras de Cádiz y Málaga. Posteriormente, en los años 80 empieza una recuperación importante de la especie cuya expansión ya es patente en todos los núcleos históricos de la Península. Braza et al. (1989) describen la distribución del corzo y otros ungulados en España, destacando la presencia estable y continua de la especie en toda la Cordillera Cantábrica, Pirineos, Montes de León, mitad norte del Sistema Ibérico, Sistema Central hasta las proximidades de Gredos y núcleos aislados en Montes de Toledo, Sierra Morena y Sierras de Cádiz y Málaga.

Características generales de la especie

En lo que respecta al género *Capreolus*, el corzo europeo (*C. capreolus*) es generalmente menor que el corzo siberiano (*Capreolus pygargus*), con diferencias pronunciadas en las dimensiones del tamaño corporal y la cuerna fundamentalmente, aunque con cierto solapamiento entre los rangos extremos de ambas especies (Danilkin, 1996). El género *Capreolus* se reconoce por la presencia en los machos de cuernas con tres puntas por lo general, con abundante perlado y por un escudo anal blanco con pelo erizable que rodea una cola rudimentaria. En comparación con el resto de cérvidos europeos, el corzo tiene un rumen más pequeño y un metabolismo mayor en relación con el tamaño corporal (Prins y Geelen, 1971).

El corzo posee un aspecto esbelto, cabeza corta y ancha con orejas grandes y cuello alargado. Su cuerpo es relativamente corto con extremidades proporcionalmente largas, con pezuñas estrechas aunque bien desarrolladas lateralmente. En los ejemplares adultos la coloración es uniforme, presentando un manto variable según la época del año, que por lo general oscila de marrón leonado al gris oscuro, con mudas en primavera y otoño. El pelaje se aclara en el vientre y en la parte interna de las patas. Las únicas zonas con diferente color son la chapa o espejo anal blanco, el interior de las orejas, los párpados y labios de color blanco sucio, el bigote negro en el labio superior y unas manchas blanquecinas conocidas como babero, que aparecen en la parte anterior del cuello en la mayoría de las poblaciones. El gran ámbito de distribución de la especie y los ambientes variados en los que está presente, le aportan al corzo una gran variabilidad tanto morfológica como ecológica propiciando la aparición de formas locales (Aragón, 1993).



Figura 2. Las crías mantienen una librea moteada de color blanco durante los primeros meses de vida.

Las crías durante los dos primeros meses de vida mantienen una librea moteada (Mateos-Quesada, 2011) (Fig. 2), con dos líneas de manchas de color blanco en el dorso, separadas por una franja amplia de color oscuro, con una serie de manchas claras dispersas en los flancos que no siguen un patrón definido. Este esquema es similar a los patrones de coloración de otros cérvidos, como el pudú (*Pudu spp.*) o el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), aunque difiere considerablemente del ciervo o del gamo (*Dama dama*), en los que las manchas del dorso están muy próximas entre sí.

Contrariamente a lo que sucede en la mayoría de los cérvidos, el corzo es una especie poco dimórfica (Blant, 1987; Maillard et al., 1989). En las poblaciones españolas, tanto en las del sur (Aragón et al., 1993) como en las del norte (Costa, 1995) el dimorfismo está basado en el peso y altura a la cruz, siendo ligeramente mayor en los machos. No existen diferencias de coloración entre sexos en ninguna época del año, exceptuando el aspecto de la chapa anal (Fig. 3).

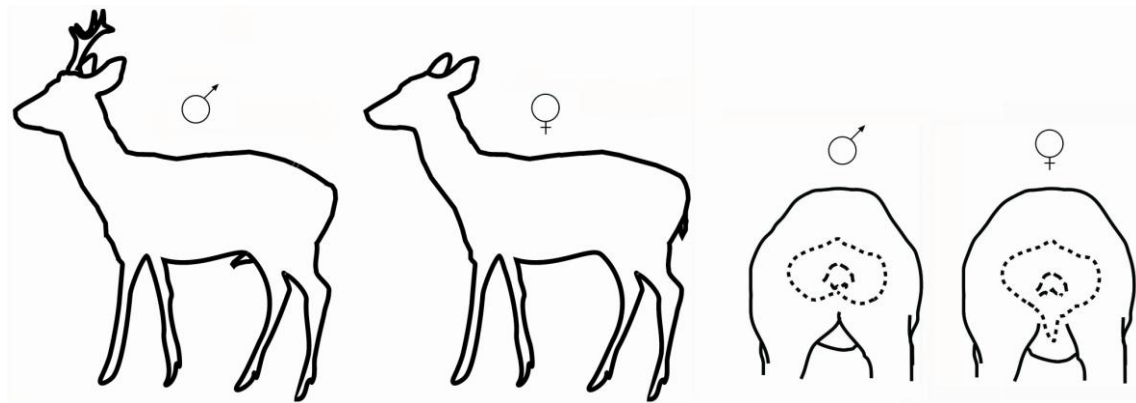


Figura 3. Diferencias en el aspecto general entre machos y hembras y en la forma del escudete o chapa anal.

El corzo tiene orejas grandes y buenos sentidos de la vista y el olfato (Mateos-Quesada, 2011). Las extremidades posteriores son más largas que las anteriores, poseyendo además, una columna más arqueada que la mayoría de ungulados, lo que le confiere gran facilidad para el salto, siendo un claro reflejo de su adaptación a hábitats boscosos, con abundante cobertura arbustiva (Costa, 1992; Danilkin, 1996).

La cuerna presente únicamente en machos, no suele superar en su asta central los 25 cm de longitud, estando compuesta de una corona o roseta en su base, de aspecto granuloso e irregular, desde donde parte un tallo principal que se ramifica normalmente en tres puntas, una dirigida hacia delante, punta anterior o luchadera, otra hacia atrás, punta posterior o candil posterior y una tercera hacia arriba, punta central (Montulet, 1984; Goss, 1983) (Fig. 4A). La cuerna se origina a partir de dos apófisis del cráneo, situadas sobre los arcos superciliares del hueso frontal, que reciben el nombre de pedúnculos de la cuerna. Su origen es óseo, creciendo desde la base hacia los extremos (Braza et al., 1994). La zona inferior de la cuerna suele estar

adornada por crestas paralelas que ostentan un desarrollo variado de forma salpicada, con excrescencias o tubérculos, denominados perlado, especialmente en la roseta. Este perlado, aunque es muy característico del género *Capreolus*, no es específico del mismo, pues aparece también en otros cérvidos como el venado de la Pampa (*Ozocoteros bezoarticus*) o el ciervo de cola blanca (Andersen, 1998). Su presencia incrementa el volumen aparente de la cuerna y aumenta la eficacia descortezadora en las épocas de marcaje oloroso (Mateos-Quesada, 2011).

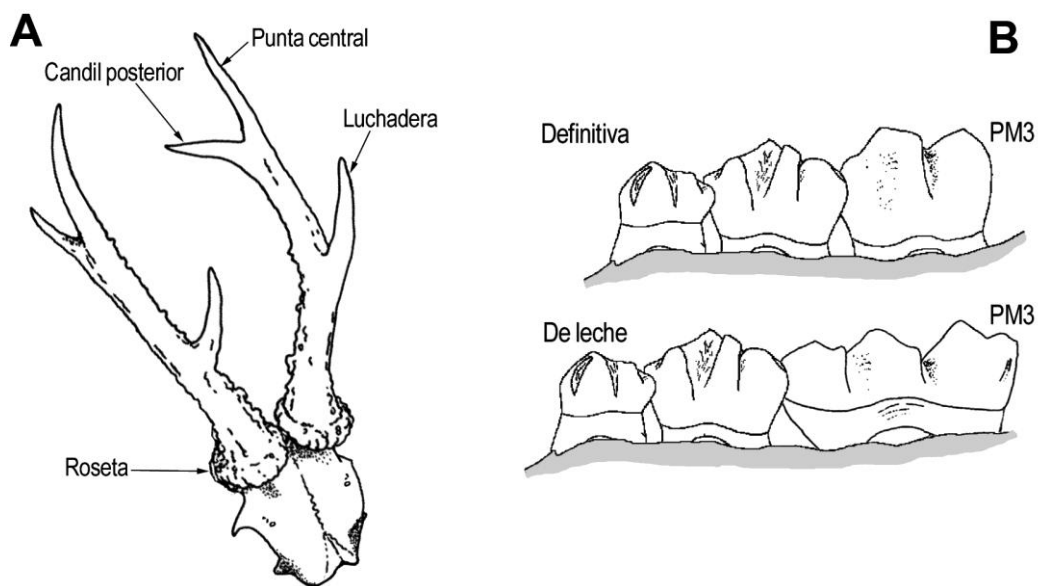


Figura 4. (A) Detalle de la cuerna del corzo y denominación de cada una de sus partes. (B) Diferencias entre los premolares de leche y definitivos.

El corzo muda la cuerna durante el mes de noviembre o más tarde, al contrario que ciervos y gamos, que realizan el desmogue entre los meses de febrero y abril. En el corzo, tras caer la cuerna, comienza enseguida un nuevo crecimiento que se prolongará durante dos o tres meses, creciendo a razón de 3 a 4 mm cada día. Las nuevas protuberancias están formadas por un esqueleto cartilaginoso, blando, compuesto de proteínas, permaneciendo cubiertas por un tejido epidérmico muy vascularizado denominado terciopelo o borra (Fig. 5), que tras un proceso de mineralización conduce al endurecimiento y la muerte del tejido, adquiriendo a partir de este momento su verdadera función (Braza, 1994).



Figura 5. Corzo macho observado en la Sierra de Guadarrama durante el mes de diciembre en el que se observa la cuerna cubierta por la borra.

La especie presenta una serie de glándulas odoríferas relacionadas con la comunicación intraespecífica que se sitúan en torno a las pezuñas y están compuestas de estrechos orificios de tejido glandular invaginado (Pocock, 1910). Los machos poseen de forma específica glándulas frontales que emplean para el marcaje territorial y, al contrario que otros cérvidos, en el corzo no aparecen glándulas preorbitales (Pielowski, 1970).

En la dentición, la característica que primero llama la atención, es la ausencia de incisivos en el maxilar superior, patrón repetido en todos los rumiantes. Los corcinos al nacer, poseen 20 dientes de leche, 14 en la mandíbula inferior y 6 en la superior, con una fórmula dentaria I 0/4 P 3/3. El recambio dentario se produce entre el 5º y el 13º mes de vida completando una dentición definitiva de 32 dientes, con una fórmula dentaria I 0/4 P 3/3 M 3/3. En raras ocasiones pueden aparecer caninos en la mandíbula superior a modo de caracteres vestigiales. En los orígenes ancestrales del corzo actual hubo especies, como las del género *Procapreolus* (Schlosser, 1924), en el Mioceno medio, que tenían caninos superiores. Estos se perdieron en la evolución del grupo, pero evidentemente algún gen residual es expresado en ocasiones, pudiendo dar lugar a la reaparición de este carácter en algún ejemplar actual (San José, 2002).

Merece especial consideración la morfología del tercer premolar, fundamentalmente como indicador de la edad. El premolar 3 de leche posee 3 lóbulos, siendo bilobulado cuando es definitivo (Fig. 4B). El doble lóbulo confiere al premolar 3 un aspecto de verdadera muela, a diferencia del premolar 2, que es relativamente simple, con la segunda cúspide vestigial o ausente.

Distribución y abundancia

El corzo europeo lleva expandiendo sus poblaciones durante los últimos veinte años en la mayor parte de Europa, tanto en términos numéricos, como respecto al área geográfica que ocupa (Gortázar et al., 2000). Las abundancias de la especie son bastante desiguales debido a la diversidad de situaciones a las que están sometidas las diferentes poblaciones, en lo que a condiciones climáticas, tipo de hábitat o situación geográfica se refiere (Fruzinski et al., 1983). Las modificaciones en el uso del hábitat y la presión cinegética, son los principales factores reguladores de su abundancia en la mayoría de su área de distribución. Muchos autores, han relacionado la gran expansión del último siglo en toda Europa con la formación del paisaje agrícola moderno (Kaluzinski, 1974).

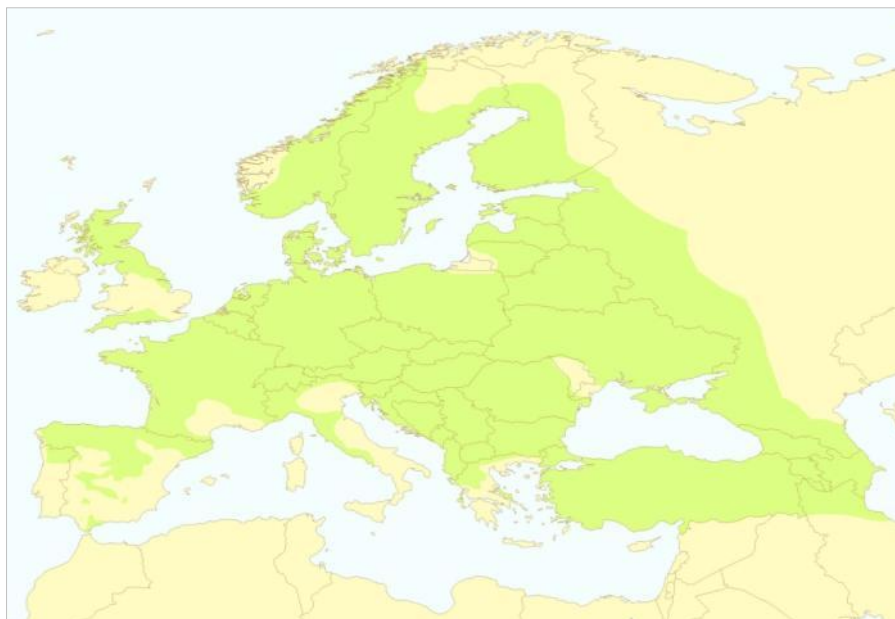


Figura 6. Distribución mundial del corzo europeo (*Capreolus capreolus*) durante la época actual (modificado de Danilkin, y Hewison, 1996).

En Europa Central y del Este, sus poblaciones se distribuyen de manera continua desde el norte de Francia hasta Rusia occidental (Fig. 6), donde su presencia se halla en todos los hábitats que le son favorables. Aquí es posible encontrarlo en la mayoría de los tipos de bosques, tanto de coníferas como de frondosas, aunque prefiere un mosaico de bosques en paisajes abiertos (Southern, 1964; Prior, 1968; Stangl y Marge, 1977). A medida que se descende hacia zonas más meridionales, la situación cambia notablemente, apareciendo un patrón de distribución caracterizado por el fraccionamiento de las poblaciones y la tendencia a la disminución en la abundancia. En las penínsulas mediterráneas, las poblaciones por lo general quedan restringidas a áreas montañosas.

En consonancia con el resto de Europa, en la Península Ibérica el corzo está sufriendo un aumento importante durante la últimas dos décadas (Fig. 7A), alcanzando ya el medio millón de ejemplares (Centenera, 2005). En España, la presencia de corzo más estable y numerosa se encuentra en todo el norte, desde Galicia hasta el País Vasco y Pirineos, donde se han localizado las mayores densidades. En estas zonas las poblaciones se distribuyen de forma continua, colonizando nuevos territorios en la última década y ocupando una variada gama de biotopos, desde los hayedos y robledales, hasta los bosques de acebos de las zonas más soleadas. Las poblaciones de Pirineos han sufrido un aumento notable en los últimos años duplicando su área de distribución. En el Pirineo Navarro existe un núcleo que se expande hacia la parte oriental de Guipúzcoa y Navarra por el Sur y otro en el Pirineo aragonés que actúa como población fuente de ejemplares hacia la Sierra de Guara. Las poblaciones de las zonas montañosas de Lérida, Gerona y Barcelona proceden en su mayoría de las repoblaciones efectuadas por el ICONA en los años 80 en el Alto Pallars-Arán, en Lérida. La especie en esta zona ocupa los bosques de abetos, pinares y hayas, ascendiendo en primavera hasta el matorral subalpino, llegando a distribuirse por encima de los 2.000 m. En los Sistemas Ibérico y Central se localiza un área de distribución homogénea, en plena expansión, llegando ya hasta la parte más occidental de Las Batuecas por el oeste y a la Serranía de Cuenca por el este. Aquí se sitúa una de las poblaciones históricas que había quedado aislada en la Sierra de

Altomira, entre Guadalajara y Cuenca, que ha experimentado un gran aumento en los últimos años, colonizando gran parte de la Alcarria y el este de la provincia de Madrid. Los robledales, pinares y matorrales de montaña son los biotopos más frecuentados por la especie en estas sierras del Centro Peninsular (Horcajada, 2005). En los Montes de Toledo, la expansión se ha producido más tarde que en las poblaciones del norte Peninsular, aunque en la última década ha sido bastante notable. Aun así, en las grandes fincas privadas se fomenta un producto cinegético más rentable como es el ciervo (Fandos y Horcajada, 1998). En el Sur de la Península, después de un grave retroceso en el último siglo, se localizan poblaciones en diferentes provincias como Cádiz, Málaga, Córdoba, Jaén y Sevilla. Las poblaciones en estos enclaves se mantienen estables, aunque presentando densidades relativamente bajas comparadas con el resto del país. Salvo casos puntuales (Sierra de Grazalema y Los Alcornocales), estos núcleos no superan en la mayoría de los casos los 2 individuos por km². Los biotopos ocupados por estas poblaciones son los bosques de encinas, alcornoques y acebuches principalmente (Braza et al., 2004).

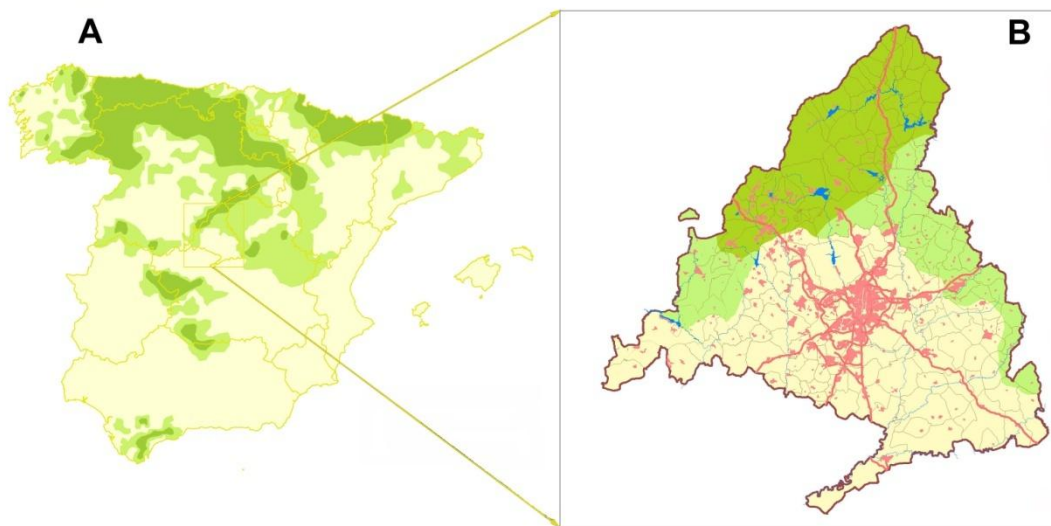


Figura 7. (A) Distribución del corzo en España (modificado de Palomo et al., 2007) y (B) en Madrid. Distribución actual (verde oscuro y claro) y áreas de presencia histórica (verde oscuro).

En la Comunidad de Madrid se ha observado una expansión notable durante las últimas décadas (FIDA, 2008) (Fig. 7B). Al igual que en la mayoría de su área de

distribución, la abundancia poblacional se relaciona fundamentalmente con la capacidad de acogida del medio, siendo determinantes también otros factores como el clima, la situación geográfica, la topografía, la depredación, las enfermedades y la competencia con otros herbívoros (Fuller, 1990). A pesar de ser una especie de tamaño pequeño y de consumir relativamente poca biomasa vegetal, presenta una serie de características generales que impiden que, por lo general, presente densidades altas. En medios con vegetación abundante y orografía compleja, como la sierra madrileña, sus poblaciones tienden a presentar un carácter monógamo, territorial y una frecuencia asociativa baja, apareciendo normalmente solos o en parejas (Horcajada, 2007). La variabilidad en la abundancia de sus poblaciones parece responder fundamentalmente a un gradiente relacionado con el tipo de hábitat, donde las mayores abundancias se alcanzarían en áreas de la sierra, con un régimen pluviométrico elevado y un paisaje formado por una alta proporción de bosques (Sáez-Royuela y Tellería, 1991). Estudios anteriores en la sierra de Madrid han demostrado la ligazón de la especie a los sectores más húmedos de los bosques mediterráneos, donde podría superar los períodos estivales críticos (detención de la productividad primaria). Igualmente, se ha visto que rechaza los jarales y que, sin embargo, selecciona positivamente los sectores ocupados por arbustos de leguminosas (retamas, piornos, cambroño). La cobertura arbórea y arbustiva también parecen ser importantes para una especie que necesita encamarse durante buena parte del día (Tellería y Virgós, 1997).

Filogenia

El género *Capreolus* L. 1758, se incluye dentro del orden de los artiodáctilos, uno de los seis órdenes de mamíferos derivados del primitivo grupo de los *Condilatra* (Carrol, 1988; Milinkovitch, 1992), caracterizados por apoyar un número par de dedos sobre el suelo al caminar, incluyendo especies tan variadas como hipopótamos, camellos, cerdos y el amplio conjunto de los rumiantes, a los que pertenecen jirafas, antílopes, ciervos, búfalos y, por supuesto, el corzo.

El grupo de los rumiantes se originó en el Eoceno tardío, hace unos cuarenta millones de años. Éstos presentan como características comunes la posesión de un estómago dividido en cuatro cavidades digestivas, la ausencia de incisivos superiores, sustituidos por un paladar cornificado y la modificación de los caninos inferiores que adquieren forma de incisivo. Los primeros cérvidos conocidos aparecen en el Mioceno de Eurasia, hace unos veinticinco millones de años, presentando una cuerna auténtica que mudaban cada año, según demuestran los registros fósiles de desmognos y de cráneos sin cuerna. Estos precursores de los ciervos actuales habitaban en las zonas de clima templado de la Mongolia actual y se expandieron desde allí hacia Europa y Norteamérica, colonizando durante el Plioceno, hace unos doce millones de años, la India y Sudamérica. Hace un millón de años, durante el Pleistoceno (período más antiguo del Cuaternario, entre los 1,8-1,6 millones y los 10.000 años), se produjo una etapa de evolución acelerada durante la cual se originó un gran número de especies, apareciendo los cérvidos actuales (Braza et al., 1994).

Para diferentes autores europeos la clasificación de la familia *Cervidae* (Gray, 1821) es confusa, mostrando numerosas inconsistencias. El origen y las relaciones existentes entre los diferentes grupos no parecen estar resueltas de forma definitiva. Estas circunstancias se aprecian especialmente en el caso del corzo, tanto para el género actual *Capreolus* (Gray, 1821) como para el antiguo *Procapreolus* (Schlosser, 1924). Algunos autores incluyen al corzo actual en la subfamilia *Cervinae* (Flerov, 1952; Sokolov, 1959), si bien generalmente se clasificaba dentro de la subfamilia *Odocoileinae* (Simpson, 1945; Heptner et al., 1961; Haltenorth, 1963; Sokolov, 1979; Grubb, 1993). Dentro de esta subfamilia, Simpson (1945) llegó a distinguir una tribu, la *Capreolini*, la cual comprende no sólo a las dos especies vivas del género *Capreolus*, sino también al género *Procapreolus*.

Todas las especies de cérvidos tienen el tercer y el cuarto metacarpos fusionados, manteniéndose los restos del segundo y quinto como rudimentos óseos. Atendiendo a la localización de estos restos óseos y según estudios más recientes sobre la filogenia de los cérvidos, basados en los análisis de la evolución y distribución de dicho grupo,

Harrington (1985) llega a la conclusión de que los grupos de cérvidos denominados *Telemetacarpalia* (contienen los elementos distales del segundo y quinto metacarpo), que incluiría al corzo, y *Plesiometacarpalia* (contienen los elementos proximales), presentan un origen independiente y polifilético. En este aspecto, cabe indicar que el género *Capreolus* es el único *Telemetacarpalia* exclusivamente euroasiático, siendo el resto o bien americanos como el pudú, las corzuelas (*Mazama* sp.) o el ciervo de cola blanca, o bien de distribución Holártica como el reno (*Rangifer tarandus*) o el alce (*Alces alces*).

Por otro lado, estudios helmintológicos, basados en el estudio de los endoparásitos, sugieren que el corzo deriva del tronco común de la familia *Cervidae*, separándose en un momento anterior a la diferenciación entre las subfamilias *Cervinae* y *Odocoileae* (Pryadko, 1972). Estas representaciones, según Danilkin (1996) indican que el corzo podría clasificarse como un grupo taxonómico independiente, quizás incluso distinguiéndolo como una subfamilia específica. Sin embargo, a través del análisis morfológico (Groves y Grubb, 1987), y más recientemente a través del análisis del ADN mitocondrial (Cronin, 1991), el corzo se asigna a uno de los cuatro linajes separados dentro de la subfamilia *Odocoileae*, originados hace de 2,5 a 5 millones de años. Además, según caracteres morfológicos (Flerov, 1952) como la estructura del cráneo, los huesos metacarpianos y los dientes (Korotkevich, 1970) y las distancias genéticas (Baccus et al., 1983; Cronin, 1991) el género *Capreolus* se encuentra más cerca de las tribus *Alcini* y *Odocoileini* de lo que éstas se encuentran de la tribu *Cervini* (Goves y Grubb, 1987). Así pues, la clasificación del antiguo género *Procapreolus* y el moderno *Capreolus* dentro de la tribu *Capreolini*, en la subfamilia *Odocoileinae*, parece ser la opción más coherente según Danilkin (1996), autor éste que propone la siguiente clasificación sistemática para la especie: Reino: *Animalia*; Filo: *Chordata*; Clase: *Mammalia*; Orden: *Artiodactyla*; Suborden: *Rumiantia*; Familia: *Cervidae* Gray, 1821; Subfamilia: *Odocoileinae* Pocock, 1923; Tribu: *Capreolini* Simpson, 1945; Género: *Capreolus* Gray, 1821; Especie: *C. capreolus* Linnaeus, 1758; Especie: *C. pygargus* Pallas, 1771.

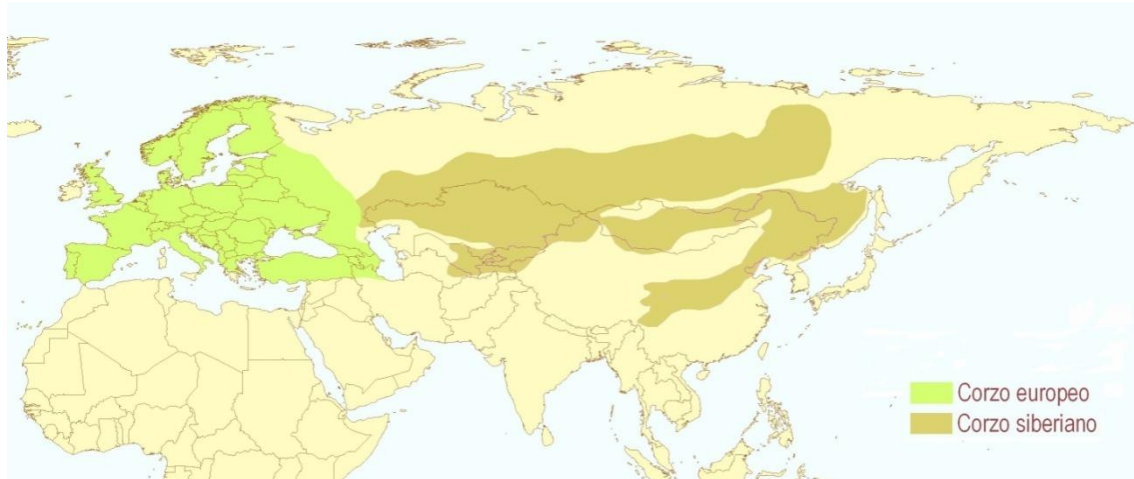


Figura 8. Áreas de distribución actual del género *Capreolus* (modificado de Danilkin y Hewison, 1996).

Es muy probable que el género *Capreolus*, distribuido actualmente por Europa y Asia (Fig. 8) haya evolucionado a partir de especies del Plioceno (5,3-1,8 millones de años), pertenecientes al género *Procapreolus* (Korotkevich, 1970, 1974), como indican las morfologías del cráneo y la cuerna. La similitud es más aparente en el corzo siberiano (*C. pygargus* Pallas, 1771) como se observa en la figura 9. Los restos fósiles más cercanos al corzo europeo actual, en Europa Occidental, se corresponden con la especie *C. suessenbornensis*, la cual fue descrita por Kahlke (1956) basándose en estudios de tipo morfométrico (Kahlke, 1956, 1958a, b, 1969). Los datos faunísticos del depósito fósil de Sussenborn pertenecen al periodo denominado Pleistoceno Medio. Para el caso de Europa Oriental, las formas del género *Capreolus* más cercanas a la especie actual están datadas en el Plioceno superior, siendo para las regiones asiáticas en su mayoría datadas para el Pleistoceno superior y periodos posteriores (Danilkin, 1996).

En cuanto a las diferencias morfológicas entre las especies actuales y los restos fósiles de las cuernas acumuladas en el Instituto Paleontológico de la Academia Rusa de las Ciencias, procedentes en su mayoría del yacimiento de la región rusa de Pavlodar, es posible asegurar que las especies existentes en el Pleistoceno presentaban un tamaño mucho mayor (Danilkin, 1996) (Fig. 9).

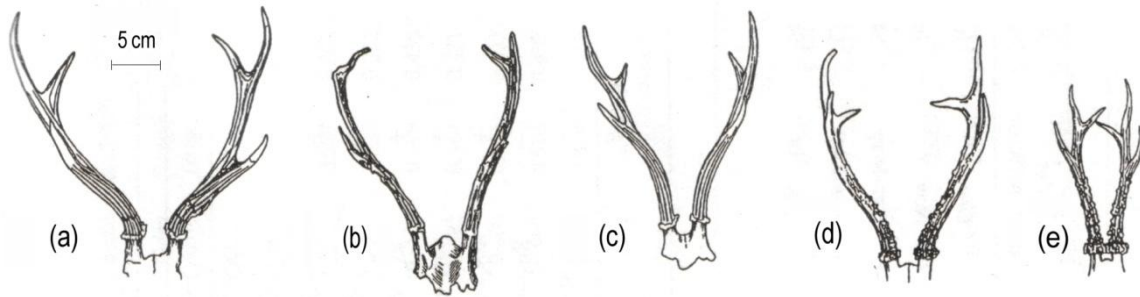


Figura 9. Forma de las cuernas: (a, b y c) *Procapreolus* (Korotkevich, 1970, 1974); (d), *Capreolus pygargus*; (e) *Capreolus capreolus*. (Modificado de Danilkin y Hewison, 1996).

Los estudios genéticos sobre poblaciones de corzos vienen desarrollándose desde la década de los años 80, de forma que hoy en día existe una amplia información sobre la caracterización genética de la especie. El aspecto más básico para definir genéticamente a una especie es la dotación cromosómica de la misma. Para el caso del corzo dicha dotación es de $2n = 70$ cromosomas, mientras que para el corzo siberiano es de $2n = 84$ cromosomas, lo que indica una importante diferencia entre las dos especies, y sustenta con fuerza la diferenciación específica propuesta por Linnaeus (1758) y Pallas (1771).

Uno de los temas más estudiados hasta la fecha es la diferenciación genética global de la especie a lo largo de toda Europa. Según Hartl et al. (1998), en el corzo esta diferenciación se considera media-alta en comparación con otros cérvidos como el ciervo, el alce o el ciervo de cola blanca. En este aspecto los distintos cambios paleogeográficos han determinado su historia evolutiva. Durante las últimas glaciaciones sus poblaciones se refugiaron en las montañas de latitudes meridionales de Italia, los Balcanes y la Península Ibérica (Wiehler y Tiedemann, 1998; Randi et al., 2004) para posteriormente seguir distintas rutas de dispersión y recolonización (Hewitt, 1999). En la Península Ibérica, existen pocos estudios que aporten datos sobre la filogeografía de la especie (Randi et al., 2004; Royo et al., 2007) aunque las fuertes reducciones poblacionales en la primera mitad del siglo XX (Tellería y Virgós, 1997; Gortázar et al., 2000), podrían haber mermado su la variabilidad genética.

Estado sanitario de las poblaciones

Las patologías constituyen para muchos vertebrados un factor ecológico de igual importancia que la depredación, la disponibilidad de recursos tróficos o la territorialidad (Krebs, 1995). El incremento del área de distribución del corzo y sus abundancias en la Península Ibérica durante las últimas décadas, han potenciado los factores de riesgo epidemiológico como el contacto con otros ungulados domésticos y silvestres, mayores frecuencias de contacto entre individuos y situaciones de mayor limitación de los recursos (Acevedo, 2005). En consonancia con esta afirmación, es deseable incrementar los conocimientos actuales sobre esta materia, de forma que además se obtengan valores de referencia y criterios objetivos que permitan minimizar los riesgos en las operaciones de traslado y, en general, optimizar el seguimiento sanitario de sus poblaciones.

El corzo es uno de los cérvidos más sensibles a los procesos parasitarios, motivo por el cual son escasas las poblaciones de este ungulado mantenidas en cautividad (Dollinger, 1981), siendo el cérvido con mayor diversidad de formas parasitarias, al menos en lo referente a nemátodos (Morales y Pino, 1993).

Los procesos parasitarios son una de las principales causas de enfermedad citadas (hasta 50% de las bajas) en los cérvidos europeos, siendo las nematodosis pulmonares e intestinales y las distomatosis hepáticas las más importantes (Jean del, 1969; Chroust, 1989). Sin embargo, no siempre queda claramente demostrada la etiología parasitaria de las muertes, habiendo autores que sugieren que las infestaciones parasitarias elevadas, son más bien una consecuencia de otros procesos o de deficiencias nutricionales (Dingeldein, 1982; Sugar, 1997).

Actualmente existen evidencias de que la abundancia de parásitos gastrointestinales en rumiantes puede tener gran importancia en su dinámica poblacional (Arneberg et al., 1996). Los parásitos pueden disminuir el éxito reproductivo, ya sea mediante un efecto directo que provoque abortos o a través de un impacto negativo sobre el crecimiento y la condición corporal (Joly y Messier,

2005). Este efecto puede ser el resultado de sutiles interacciones entre el hospedador, los parásitos y el medio ambiente, por lo que la infección puede estar supeditada a factores tales como disponibilidad de alimentos o infecciones (Smith et al., 2005). Se ha demostrado en ungulados silvestres que las infecciones por parásitos, aún sin presentar señales visibles, reducen significativamente la fecundidad. Piozet al. (2008), estudiaron los efectos a largo plazo sobre el éxito reproductivo de la densidad, el clima y la carga parasitaria en una población de rebeco. Este enfoque permitió identificar, en una población natural, los factores de confusión del clima y del parasitismo en la fecundidad. Tras considerar la densidad, la prevalencia de anticuerpos explicó el 36% de la variación anual en el éxito reproductivo y las condiciones meteorológicas el 31%.

Con respecto a los procesos infecciosos en comparación con otros cérvidos ibéricos, como el ciervo y el gamo, el corzo presenta dos diferencias: en primer lugar, su importancia como reservorio de enfermedades de especial relevancia (por ejemplo la tuberculosis) parece menor que la de otros cérvidos, al ser un ramoneador selectivo y menos gregario que las otras especies de cérvidos (Mussa et al., 2003). En segundo lugar, el conocimiento existente sobre su estado sanitario también es menor, particularmente en comparación con el ciervo.

En Europa, se han llevado a cabo algunos estudios sobre enfermedades infecciosas con el fin de averiguar el estado sanitario de los corzos en los diferentes países y situaciones. Estos estudios han aportado datos sobre pestivirus y herpesvirus, paratuberculosis y otras enfermedades bacterianas y protozoos principalmente incluyendo *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* (Boadella et al., 2010). Sin embargo, salvo algunas excepciones (Boadella et al., 2010; Pato, 2011) existe un conocimiento limitado sobre las enfermedades infecciosas de los corzos de la Península Ibérica.

Los glucocorticoides fecales como indicadores de estrés fisiológico

El estrés fisiológico se puede definir como una serie de cambios fisiológicos y neurofisiológicos (cambios en el ritmo cardíaco y respiratorio, temperatura corporal,

presión sanguínea, niveles de glucocorticoides, etc.) debidos a diferentes estímulos internos (herida, enfermedad, miedo) y externos (hacinamiento, perturbaciones humanas, competencia por los recursos, escasez de alimento) denominados estresores. Estos cambios se producen de manera secuencial y con distintas repercusiones sobre el organismo, en un proceso denominado Síndrome de Adaptación General, con el fin de que el organismo recupere el equilibrio homeostático (Selye, 1936; Mateos, 2003).

Los estímulos adversos inician en los animales una cascada de respuestas fisiológicas que incluyen la activación del eje corticotropo (HPA: hipotálamo-pituitaria-adrenal) (Fig. 10) y la síntesis y secreción subsiguientes de glucocorticoides por la corteza adrenal (Axelrod y Reisine, 1984; Matteri et al., 2000; Stewart, 2003; Pfaff et al., 2004). Cuando actúa sobre el organismo un agente estresante, el hipotálamo va a secretar corticotropina (CRH) que a su vez va a estimular la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) por la hipófisis. La ACTH circula por el torrente sanguíneo hasta la corteza adrenal y estimula la secreción de glucocorticoides (cortisol y corticosterona). Los esteroides adrenales que circulan en sangre, son metabolizados en el hígado y/o riñón antes de ser excretados en la orina o bilis y de la bilis son liberados al tracto gastrointestinal y eliminados en las heces.

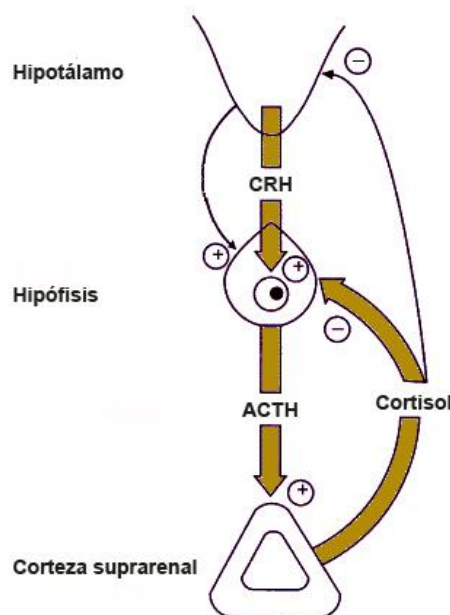


Figura 10. Respuesta fisiológica de estrés en vertebrados donde se puede apreciar la activación el eje corticotropo y la secreción de glucocorticoides (modificado de Sapolsky, 1994).

El nivel basal de glucocorticoides en un individuo, está regulado vía retroalimentación negativa por los propios glucocorticoides que actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis (Randall et al., 1998). Cuando la secreción de glucocorticoides ocurre durante un período de tiempo corto, la respuesta de estrés es adaptativa y beneficiosa para el organismo (“eustrés”). Así, las dos primeras fases del síndrome de adaptación general constituyen un mecanismo fisiológico adaptativo cuya función es preparar al organismo para situaciones de huida, captura de presas, comportamiento sexual, etc. Sin embargo, si dicha respuesta es a largo plazo (“distrés”) la retroalimentación negativa se desajusta y la respuesta de estrés se vuelve tan nociva como el propio agente estresante, dando lugar a patologías como supresión reproductora, supresión inmunológica y aparición de úlceras, reducción de la condición física por desajustes en el metabolismo de la glucosa, entre otras muchas (Stewart, 2003).

Hasta hace pocos años para cuantificar los niveles de glucocorticoides se usaban principalmente muestras procedentes de plasma (Terlouw, 1997). Sin embargo, la recolección de dichas muestras es un método invasivo, pues requiere la captura y manejo de los animales (Young *et al.*, 2004) y produce además estrés en los mismos (“estrés de captura”). Además, la secreción de glucocorticoides en sangre varía a lo largo del día, exhibiendo patrones secretores pulsátiles que disminuyen la eficacia del método, por lo que las concentraciones de estas hormonas en plasma son muy variables y no son representativas de efectos a largo plazo (Harper y Austad, 2000). Sin embargo, los glucocorticoides fecales son el producto tanto de la secreción como del metabolismo a lo largo de muchas horas, lo que hace posible, obviando otras cuestiones, la recolección de las muestras fecales a cualquier hora del día. El análisis de metabolitos de los corticosteroides fecales cuantifica la cantidad total excretada y, por tanto, refleja el patrón de secreción de glucocorticoides generalmente de manera más fiable que las muestras de sangre (Harper y Austad, 2000; Palme et al., 2005). Además, el uso de muestras fecales en los estudios de estrés fisiológico tiene la ventaja de que

su recolección es más fácil, al no ser necesaria la manipulación de los animales estudiados. Estas nuevas metodologías no invasivas, resultan ser herramientas muy útiles en todas las disciplinas relacionadas con la Biología de la Conservación. Los niveles de glucocorticoides fecales han sido usados en muchos estudios como indicadores fisiológicos de estrés en distintas especies de mamíferos (Möstl y Palme, 2002) como la marta europea (*Martes martes*) (Barja et al., 2007), el lobo (Sands y Creel, 2004; Barja et al., 2009), el tejón (*Meles meles*) (Barja et al., 2012), el gato montés (*Felis silvestris*) (Piñeiro et al., 2015), el rebeco (Zwijacz-Kozica et al., 2013) el ciervo (Huber et al., 2003) y el corzo (Dehnhard et al., 2001; Escribano-Ávila et al., 2013), entre otros.

ÁREA GENERAL DE ESTUDIO

ÁREA GENERAL DE ESTUDIO

El área de estudio, unas 139.000 ha (Fig. 11), incluye la vertiente madrileña de la Sierra de Guadarrama, con 21.714 ha dentro del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama declarado a través de la Ley 7/2013, de 25 de junio. Además, engloba a su vez otras figuras de protección de espacios naturales como los Sitios Naturales de Interés Nacional declarados en los años treinta, de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara, de la Pedriza del Manzanares y el Pinar de la Acebeda, el Parque Natural de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara, el Parque Regional de la Cuenca Alta del Manzanares, la Reserva de Biosfera de la Cuenca Alta del Manzanares, la Reserva de la Biosfera de la Sierra del Rincón y los Humedales del Macizo de Peñalara, incluidos en la lista de humedales de importancia internacional del Convenio de Ramsar.

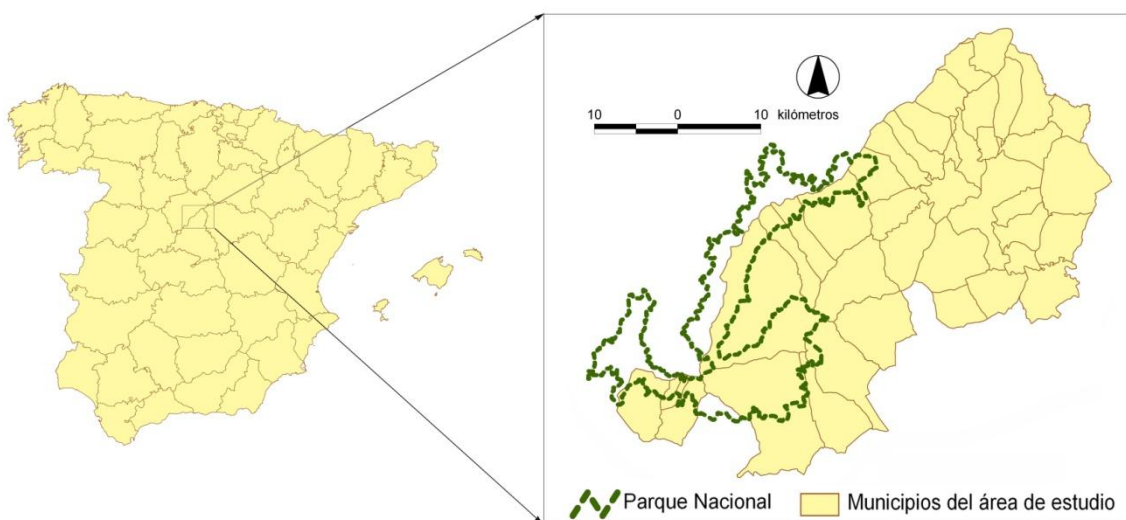


Figura 11. Localización del área de estudio en España, detalle de los municipios de la Comunidad de Madrid que la conformaban y límites del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama.

Desde el punto de vista de la Geología, la Sierra de Guadarrama forma parte del Sistema Central, que es un fragmento de Macizo Ibérico que fue deformado durante la orogenia Alpina. La diversidad de materiales geológicos de la Sierra es relativamente reducida, ya que en ella predominan las rocas metamórficas (gneises y esquistos) e ígneas (granitoides) de carácter ácido. En el valle del Lozoya, también aparecen materiales detríticos y carbonatados del Cretácico y el Paleógeno. Las formaciones

superficiales atribuibles al Cuaternario ocupan una extensión pequeña y están compuestas principalmente por aluviones, coluviones y morrenas.

La Sierra de Guadarrama es un conjunto montañosos muy complejo que flanquea la Comunidad de Madrid por el norte. Forma parte del Sistema Central, surgido de la Orogenia Alpina, con un relieve de estructura fallada, labrado fundamentalmente sobre gneis y granitos. Los rasgos geomorfológicos más destacables son los debidos a la acción de los hielos durante el Cuaternario (Peñalara, Cuerda Larga y Montes Carpetanos), y a la presencia de relieves graníticos y de gneis de morfología muy variada (La Pedriza y La Cabrera), que se distribuye desde el puerto de Somosierra hasta el valle del Alberche.

En los Montes Carpetanos y el Macizo de Peñalara, se concentran las mayores altitudes de la Comunidad de Madrid. Estos sistemas montañosos impiden a menudo el paso de las masas de aire húmedo procedentes del Atlántico, lo que aporta a la región centro de la Península Ibérica un clima mediterráneo templado con características de mediterráneo continental, e influencias de un clima propio de regiones montañosas. La continentalidad, sin embargo, es relativamente acusada, ya que la mayor parte del territorio está sometida a climas de tipo semicontinental o continental. En general la Sierra de Guadarrama estaría sometida a diversos tipos de climas mediterráneos, desde los menos fríos y secos de las zonas más bajas hasta los más fríos y húmedos de las comarcas serranas. A grandes rasgos en el clima del área de estudio es clara la dependencia de la latitud geográfica en la que se encuentra - entre los 40° y 41° de latitud Norte y de su posición central en la Península, a mitad de camino entre el océano Atlántico y el mar Mediterráneo.

La altitud media del territorio es elevada, como corresponde a su situación en el centro de la Meseta Castellana y a la presencia del Sistema Central. La diferencia de relieve entre las cumbres y el piedemonte también es muy grande. Esta diferencia de relieve es el principal factor de control de la distribución de precipitaciones y temperatura (Fig. 12) y, en definitiva, es la causa principal de la diversidad climática.

De este modo, en el territorio, el régimen hídrico varía desde subhúmedo a perhúmedo. Sin embargo, la falta o déficit de agua estival, característica del clima mediterráneo, no desaparece ni siquiera en las zonas de clima más húmedo.

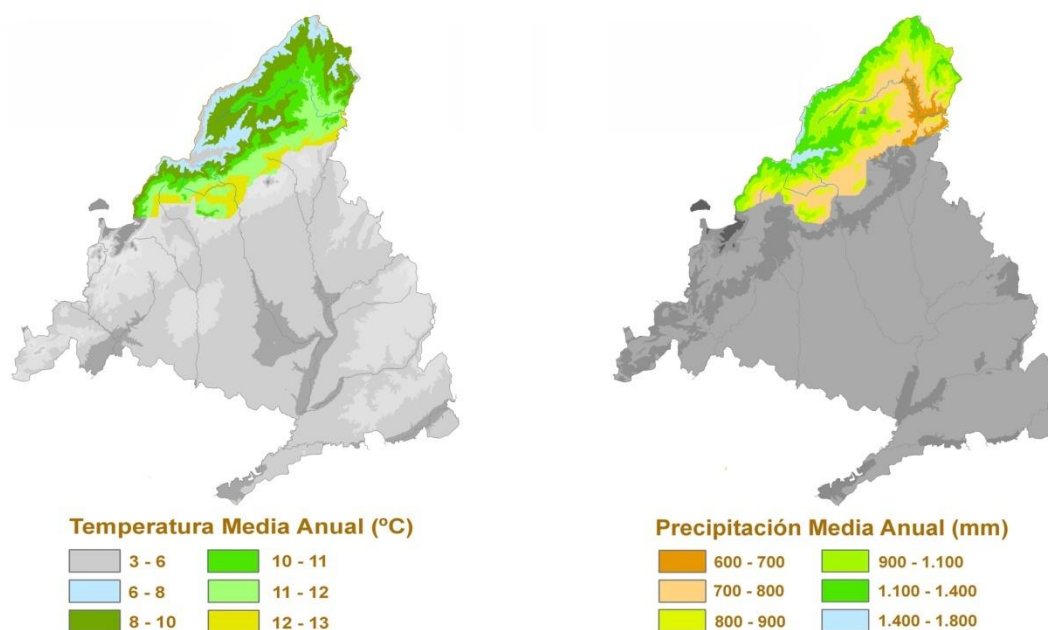


Figura 12. Precipitación y temperaturas medias anuales del área de estudio (modificado de CIAM, 2005).

Como consecuencia de la complejidad del relieve y posición geográfica, el clima de la Sierra de Guadarrama es muy variado. Según la tipología fitoclimática de Rivas Martínez (1987), existe representación de casi todos los pisos bioclimáticos mediterráneos: desde el mesomediterráneo hasta el crioromediterráneo, pasando por el supramediterráneo y el oromediterráneo (Fig. 13). Lo mismo sucede con los ombrotipos, ya que están presentes desde el seco (350-600 mm/año) hasta el hiperhúmedo (1.600-2.300 mm/año), con fuertes gradientes debidos a la complejidad del relieve y a las diferentes orientaciones de sus sierras.

El río Tajo es el recolector de la red fluvial del área de estudio, formada principalmente por los ríos Lozoya, Guadalix, Manzanares. Además, existe una regulación y aprovechamiento de estos ríos mediante embalses y trasvases intercuenca. Sin embargo, la mayor parte del área de estudio se sitúa aguas arriba de dichos aprovechamientos, por lo que el régimen hídrico de buena parte de ellos está

muy próximo a las condiciones naturales. Estos ríos y arroyos suelen ser de lecho rocoso, careciendo de llanuras aluviales o presentando estas últimas un desarrollo muy escaso. Los materiales geológicos de la Sierra de Guadarrama presentan una capacidad bastante limitada para almacenar y transmitir agua. Solamente los materiales cretácicos llegan a constituir acuíferos de cierta entidad. A pesar de ello, y dada la alta pluviosidad de la Sierra, la descarga subterránea es suficiente para mantener caudales permanentes en muchos de los arroyos presentes en el área de estudio.

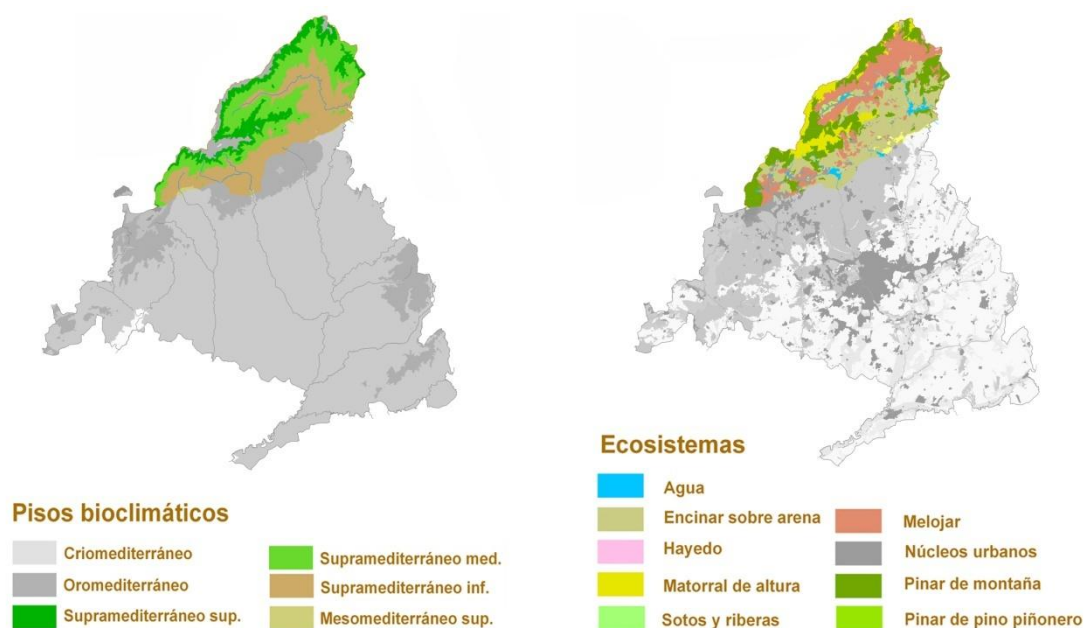


Figura 13. Pisos bioclimáticos y ecosistemas del área de estudio (modificado de CIAM, 2005).

Los sistemas de lagos y lagunas de montaña están representados en el macizo de Peñalara, donde existe un conjunto de pequeñas lagunas, tanto temporales como permanentes, así como otras zonas húmedas con turberas y cervunales. En el resto de la Sierra, los humedales son escasos y de pequeña extensión.

Flora y fauna asociadas al área de estudio

La Sierra de Guadarrama pertenece al Sistema Central y biogeográficamente se enmarca en el Sector Guadarrámico de la subprovincia Carpetana, provincia Carpetano-Ibérico-Leonesa, superprovincia mediterráneo-iberoatlántica de la Región Mediterránea (Rivas Martínez, 1992). El área de estudio presenta una riqueza florística

elevada, más de 1.500 taxones de flora vascular, que suponen más de la mitad de la flora de la Comunidad de Madrid (Fernández González, 1988; Blanco, 2001).

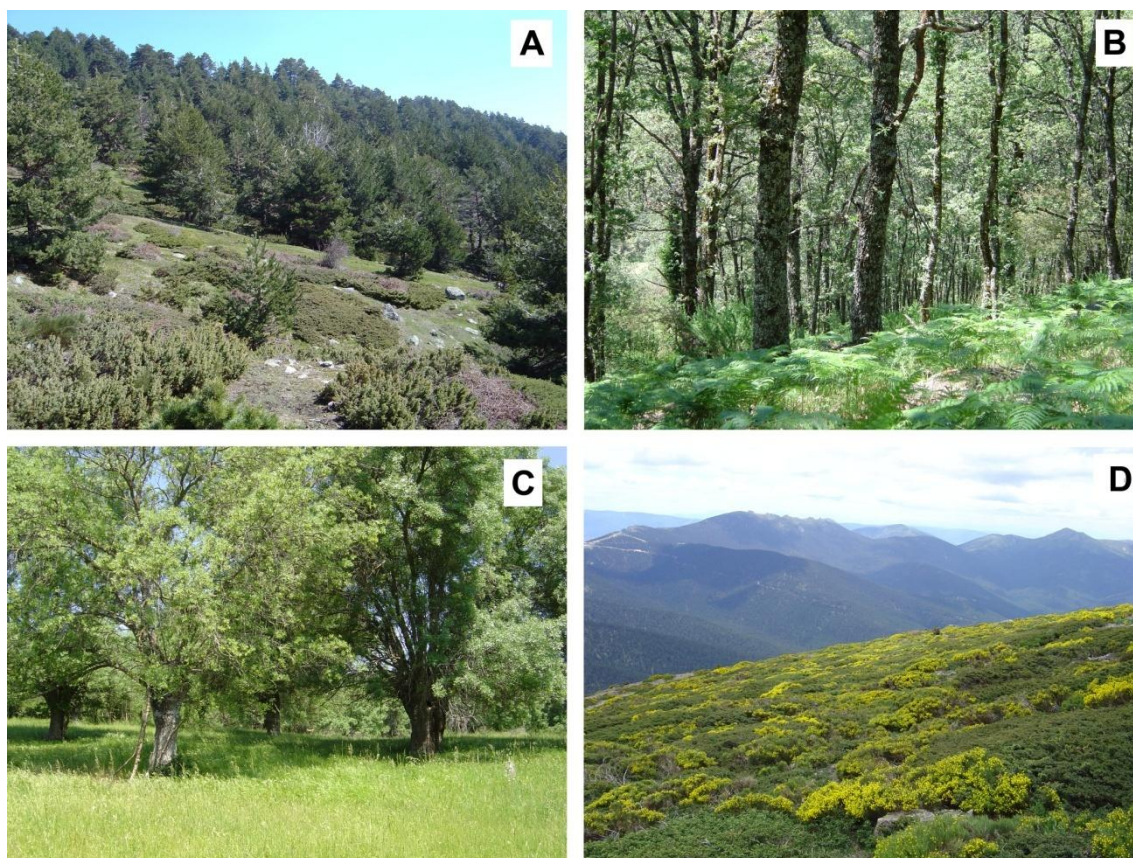


Figura 14. Principales unidades de vegetación sobre las que se ha desarrollado el estudio. (A) Pinares de montaña, (B) rebollares, (C) fresnedas de fondo de valle y (D) matorrales de altura.

En la Sierra de Guadarrama la vegetación y los roquedos son los dos elementos fundamentales del paisaje, ocupando la vegetación una mayor extensión (López Lillo, 1992). El paisaje vegetal que hoy percibimos es fruto de una serie de acontecimientos que han sucedido a lo largo del tiempo y que han originado importantes cambios en la estructura y composición de los bosques, con manifestaciones de carácter geológico, climático y de origen humano (Costa et al., 1992) que han conformado las principales unidades de vegetación en las que se ha desarrollado el presente estudio (Figs. 13 y 14).

Los pinares de montaña son bosques compuestos mayoritariamente, en su estrato arbóreo, por el pino silvestre (*Pinus sylvestris*). Estos bosques constituyen la vegetación

potencial del piso oromediterráneo guadarrámico. Se trata de formaciones naturales, bien conservadas en general, situadas entre los 1.200 y 1.900 m sobre el nivel del mar. Los bosques de pino albar en la Comunidad se reparten entre Abantos, La Fuenfría, Siete Picos, Navacerrada, Morcuera, Alto Lozoya y las Sierras del Rincón y Cebollera, abarcando una superficie de unas 26.266 ha de las cuales 18.722 pertenecen a bosques de repoblación. En las zonas más bajas, las masas de pino albar han sido mantenidas artificialmente en detrimento del robledal, haciendo muy difícil reconocer su área natural de distribución. No obstante, en la parte superior donde las condiciones climáticas son extremas y los suelos están menos desarrollados, el pinar aparece de forma natural en buena parte de su distribución. Las zonas que mejor estructura conservan están formadas por un buen dosel arbóreo de *P. sylvestris* con tangencia de copas y un sotobosque de matorral denso, cuya composición florística es similar a la del piornal supraforestal, con presencia de especies como piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*), enebro común (*Juniperus communis*) o cambroño (*Adenocarpus hispanicus*) enriquecido con alguna otra especie como acebo (*Ilex aquifolium*) y pies aislados de roble melojo (*Quercus pyrenaica*).

Estos ambientes, con diversidad de arbolado y matorral, cobijan ricas comunidades faunísticas, gracias a las amplias posibilidades que ofrecen para conseguir alimento y refugio. Algunas de las aves que caracterizan la comunidad propia de los ecosistemas forestales son el buitre negro (*Aegypius monachus*), águila culebrera (*Circaetus gallicus*), azor común (*Accipiter gentilis*), gavián común (*Accipiter nissus*), cárabo común (*Strix aluco*), búho chico (*Asio otus*), pito real (*Picus viridis*) y carbonero garrapinos (*Periparus ater*) (Tellería, 1987).

Entre la comunidad de micromamíferos representativa del pinar se pueden encontrar ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), topillo campesino (*Microtus arvalis*), topillo lusitano (*Microtus lusitanicus*) y varias musarañas (*Sorex granarius*, *S. minutus* subsp. *carpetanus* y *Crocidura russula*). Además del corzo (*Capreolus capreolus*) (Fig. 15C), el pinar sirve también de refugio a otros muchos mamíferos como jabalí (*Sus*

scrofa) (Fig. 15A), garduña (*Martes foina*), turón (*Mustela putorius*) y ardilla roja (*Sciurus vulgaris*).

También son numerosos los reptiles y anfibios presentes en las comunidades forestales con varias especies que se distribuyen desde las zonas más bajas del valle hasta el pinar: salamandra común (*Salamandra salamandra*), tritón jaspeado (*Triturus marmoratus*), rana patilarga (*Rana iberica*), eslizón tridáctilo (*Chalcides striatus*), lagarto verdinegro (*Lacerta schreiberi*), víbora hocicuda (*Vipera latastei*). Por el contrario, otras especies son características de los ecosistemas de zonas más altas y aparecen por primera vez en el pinar: lagartija roquera (*Podarcis muralis*) o culebra lisa europea (*Coronella austriaca*).

Los bosques de roble rebollo o melojo ocupa el piso montano entre 1.700 y 1.400 m, extendiéndose por toda la sierra de Guadarrama. En la mayor parte de todo ese territorio, al robledal le corresponde el papel de bosque dominante en función de las condiciones mesoclimáticas. En la actualidad, la mayor parte de las formaciones son de árboles jóvenes con gran cantidad de ejemplares procedentes de cepa. Fueron aprovechados antiguamente para leñas y carboneo mediante talas y entresacas, y con frecuencia aclaradas o adehesadas para pastos. Aun así, en muchos enclaves serranos se pueden encontrar individuos maduros que conservan en buenas condiciones la estructura de la comunidad, constituyendo ejemplos de los bosques originales.

Además de la variedad de condiciones originadas por el hombre, los robledales presentan distintas formas, desde las formaciones más puras hasta los bosques mixtos con otras frondosas y con el pinar, pasando por zonas adehesadas con fresno en los fondos del valle. En amplias zonas de la Sierra de Guadarrama, la etapa de degradación del roble se caracteriza por la presencia de jarales de estepa o cantuesares en las zonas más altas. Existen, de forma puntual, híbridos del roble con quejigos. Esta presencia es difícil de correlacionar con peculiaridades edáficas y parece significar un relicto de bosques mixtos de roble y quejigo que debieron existir en algunas cumbres arenosas de los cerros sedimentarios en la margen izquierda del Lozoya.

Los rebollares, marcan el límite superior del bosque caducifolio, salvo cuando el umbral supramediterráneo superior es ocupado por los abedulares. Este límite asciende en las vertientes más lluviosas hasta los 1.750 m, descendiendo al acentuarse la xericidad hasta los 1.600-1.650 m.

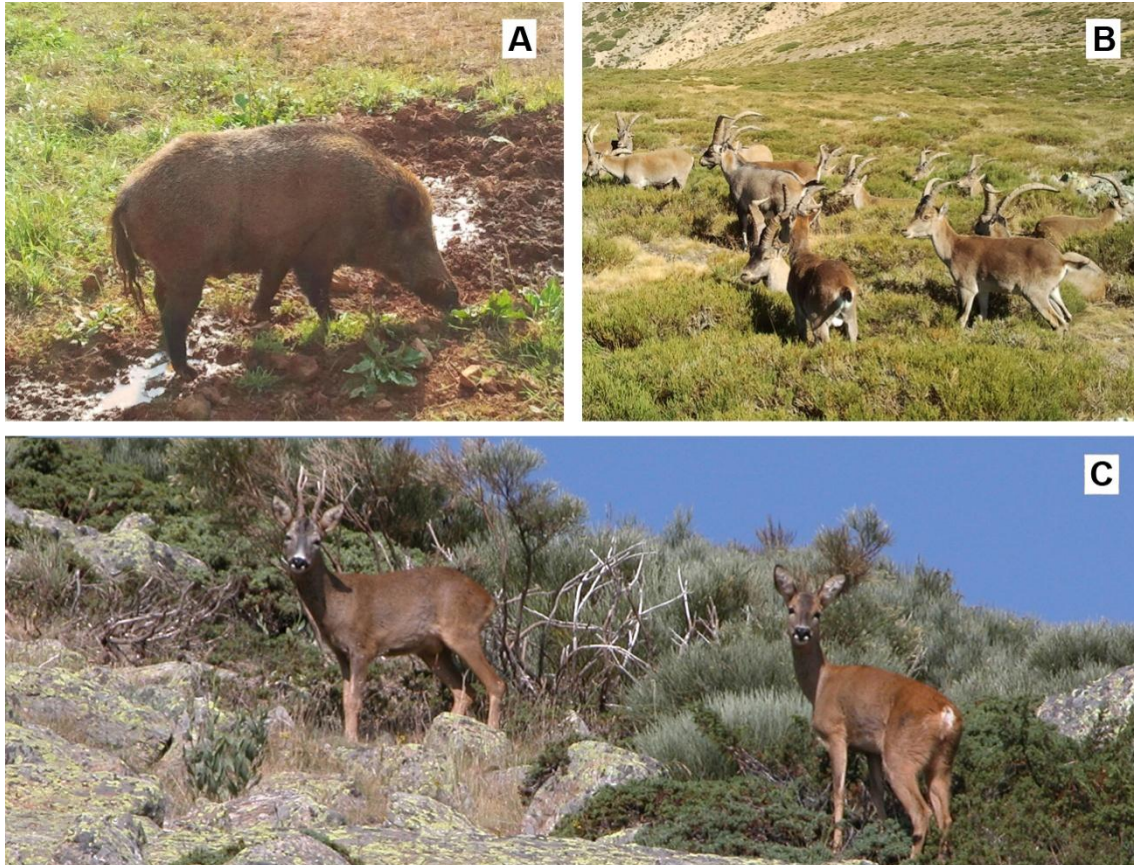


Figura 15. El jabalí (A), la cabra montés (B) y el corzo (C) son los tres ungulados silvestres del área de estudio.

Entre las enfermedades y plagas de estos bosques, aparecen las agallas de los robles provocados por las puestas de *Cynips quercus tozoe* y también de *C. kallari*, *C. aptera* y *Dryonga lichtensten*. En el sotobosque asociado aparecen el sauce negro (*Salix atrocinerea*), majuelos (*Crataegus monogina*), endrinos (*Prunus spinosa*), escaramujos (*Rosa canina*) y matorral en regresión formado por retama blanca (*Genista florida*), jara estepa (*Cistus laurifolius*), brezo blanco (*Erica arborea*) o peonía (*Paeonia broteroi*). Entre la fauna invertebrada más características de estos bosques, destacan insectos como el ciervo volante (*Lucanus cervus*), el mayor de los escarabajos

de la Comunidad de Madrid, y la lagarta peluda (*Limantria dispar*), un lepidóptero que ocasiona fuertes defoliaciones en quercíneas. Por su parte, la comunidad de aves es, en general parecida que la descrita anteriormente para el pinar silvestre abundando también el pinzón vulgar (*Fringilla coelebs*), curruca mosquitera (*Sylvia borin*), herrerillo común (*Cyanistes caeruleus*), mito (*Aegithalos caudatus*) y milano real (*Milvus milvus*) entre otros.

Los matorrales de altura, son comunidades ampliamente extendidas por toda la sierra, en las zonas de cumbres y laderas altas, donde constituyen la vegetación principal entre los 1.800 y 2.200 m, inmediatamente por encima de los pinares. Constituye una formación muy densa y de gran cobertura, aunque el matorral no alcanza mucha altura, alrededor de un metro, debido al peso de la nieve y a la fuerza de los vientos. Las especies de matorral dominantes en esta comunidad son el piorno serrano y el enebro rastrero. En las laderas más soleadas, también es frecuente el cambroño. La gran cobertura del matorral dificulta el desarrollo de otras plantas debajo aunque su cobijo resulta fundamental para algunas especies vegetales y animales. En el estrato subarborescente, cabe destacar el espárrago de lobo (*Orobancha rapum-genistae*), planta parásita del piorno, que llama la atención por su color pardo. Algunas de las integrantes del discontinuo estrato herbáceo son la *Avenella flexuosa* subsp. *iberica*, *Festuca carpetana*, *Senecio pyrenaicus* subsp. *carpetanus*, *Luzula lactea*, *Linaria nivea* y *Arenaria montana*. Las comunidades faunísticas de los hábitats supraforestales son muy similares entre sí. La comunidad de aves está integrada por especies como el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), codorniz (*Coturnix coturnix*), alondra común (*Alauda arvensis*), avión roquero (*Ptyonoprogne rupestris*), bisbita campestre (*Anthus campestris*), acentor común (*Prunella modularis*), acentor alpino (*Prunella collaris*), ruiseñor pechiazul (*Luscinia svecica*), colirrojo tizón (*Phoenicurus ochruros*), collalba gris (*Oenanthe oenanthe*), roquero rojo (*Monticola saxatilis*) (Tellería, 1987). En la comunidad de mamíferos representativa de los hábitats del sector supraforestal destaca, la cabra montés (*Capra pyrenaica*) (Fig. 15B), con poblaciones muy abundantes que provienen de las repoblaciones realizadas en los años 90 con ejemplares procedentes de la Sierra de Gredos (Refoyo, 2012). Además se

puede observar el topillo nival (*Chionomys nivalis*) como especie propia de estos medios de alta montaña, que tiene gran interés por su distribución muy localizada en la Sierra de Guadarrama (Blanco et al., 1.983). Por último, entre los reptiles y anfibios que se encuentran en las comunidades de la zona supraforestal destacan la salamandra común, sapo partero común (*Alytes obstetricans*), tritón alpino (*Mesotriton alpestris*), sapo común (*Bufo spinosus*), sapo corredor (*Epidalea calamita*) y lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*).

Las fresnedas de fondo de valle son los bosques y dehesas de fresno (*Fraxinus augustifolia*) que se extienden por las rampas y grandes valles internos de la Sierra, principalmente en zonas como Soto del Real o la cabecera del Valle del Lozoya. Resulta muy difícil encontrar fresnos con su porte natural, apareciendo con frecuencia desmochados como resultado del aprovechamiento ganadero. Las fresnedas adehesadas forman en muchos casos setos que limitan prados muy productivos. Este tipo de explotación, es considerado idóneo debido al mantenimiento de los bosques, de las etapas de sustitución y de la productividad agraria, fomentado la instalación de prados con abundancia de especies propias de las orlas arbustivas espinosas, herbáceas y escionitrófilas como las rosas, zarzamoras, madreselvas, etc. El territorio se presenta dividido en pequeñas parcelas separadas entre sí por vallas de piedra con setos vivos. La explotación de estas parcelas es muy antigua, si bien es destacable el hecho de que hasta hace pocas décadas se destinaban a usos agrícolas. En la actualidad se dedican al pastoreo, con distintos tipos de gestión como prados de diente, de siega o riegos mediante caceras, respetando los árboles para dar sombra y alimento al ganado.

Las fresnedas suelen ir acompañadas por algunos otros caducifolios arbóreos como el olmo común (*Ulmus minor*), el álamo temblón (*Populus tremula*), el sauce negroy el roble melojo, con estratos arbustivo y herbáceo por lo general nutridos. Se desarrollan sobre suelos frescos con hidromorfía estacional en los horizontes supramediterráneo superior y medio. En el territorio su distribución bioclimática abarca todo el piso supramediterráneo, aunque, por razones geomorfológicas, sus

posibilidades de desarrollo en el horizonte superior, y en general, por encima de los 1.250 m, son muy limitadas. El zarzal con rosas es indicativo de degradación por cuanto se trata de una etapa subforestal, pero posee un alto valor estabilizador y regenerador de la vegetación. Su presencia tiene gran valor ecológico, dado que en su interior encuentran refugio y alimento gran número de especie animales. La abundancia de especies arbustivas espinosas, como las rosas, zarzamoras y madreselvas, producto del abandono del aprovechamiento en muchas de estas zonas, han potenciado la abundancia de especies que como el corzo o el jabalí han encontrado en estos biotopos lugares idóneos para sobrevivir, con refugio, agua y comida abundantes.

La ganadería

Actualmente, el sistema de producción ganadero en el área de estudio es básicamente extensivo y dedicado a la producción de carne (Fig. 16), centrado principalmente en el vacuno, con un pequeño porcentaje de ovino y de forma residual equino y caprino. Este tipo de ganadería es consecuencia de un proceso de especialización a la condiciones del medio físico, así como de una adaptación a las medidas derivadas de las políticas agrarias nacionales y europeas y a las influencias de la demanda de los mercados.

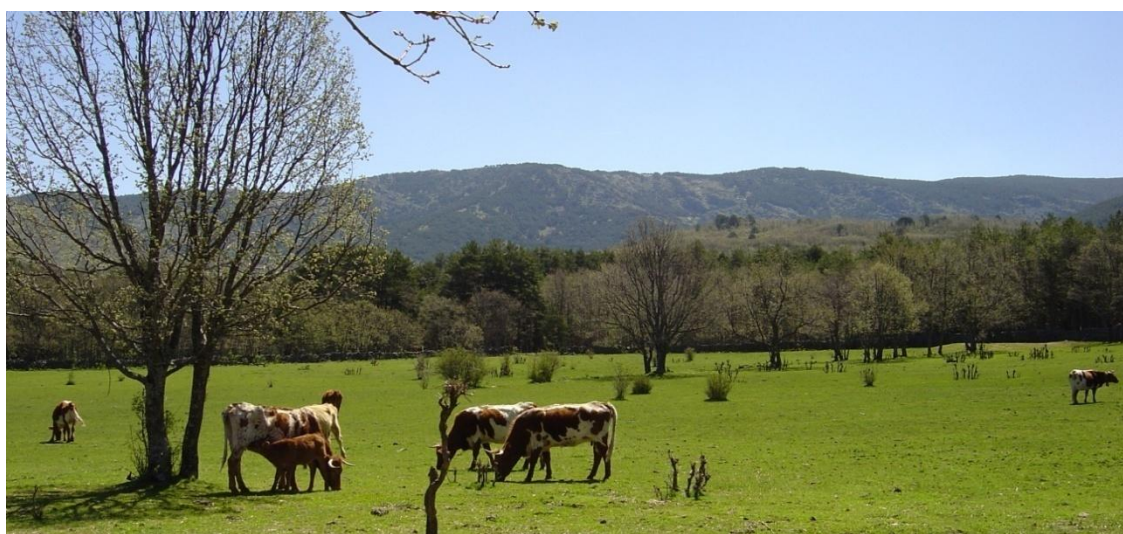


Figura 16. Ganado vacuno en sistema de producción extensivo en fresnedas de fondo de valle en la Sierra de Guadarrama.

La ganadería en la Sierra de Guadarrama ha sufrido las transformaciones más importantes en las últimas décadas. Estos cambios han afectado al tipo de ganadería, sistema de explotación y tamaño de la cabaña. En tiempos históricos tuvo importancia la ganadería trashumante de ovejas merinas, que fue decayendo progresivamente, desde un volumen muy elevado en el siglo XVIII hasta la década de 1960, cuando dejaron de tener presencia los últimos rebaños procedentes de Segovia y de Bustarviejo. Los cambios más recientes, desde hace unos 15 años, han afectado al sistema de manejo, habiendo desaparecido el vacuno de leche y las explotaciones con estabulación, que llegaron a ser muy abundantes (Díez-Guerrier, 1999). Actualmente, la ganadería está basada en el aprovechamiento de los pastos de montaña, lo cual condiciona el sistema de explotación, manejo y sanidad del ganado. En invierno, los animales descienden a zonas bajas, estando en fincas particulares o en los llamados cierres de invierno de los montes públicos, siendo su alimentación en este periodo facilitada por el hombre, consistente en forraje, (heno, paja, ensilados) y concentrado (piensos compuestos, generalmente en forma de tacos) (Díez-Guerrier, 1999).

En cuanto a los porcentajes de las distintas especies ganaderas no han variado substancialmente y el vacuno mantiene su preponderancia con aproximadamente un 90% de la cabaña, mientras que los otros tipos de ganado tienen un peso relativamente escaso (Comunidad de Madrid, 2003).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación

El corzo es un cérvido forestal de distribución Paleártico-Occidental que encuentra en la Península Ibérica el extremo suroccidental de su área de distribución. Durante las últimas décadas las poblaciones españolas han aumentado su abundancia y su área de distribución extendiéndose desde las zonas montañosas hacia las zonas de piedemonte, en donde la especie se ha visto beneficiada por la disminución de la ganadería extensiva, el abandono de la agricultura y un aumento importante de la superficie forestal. En la Sierra de Guadarrama se muestra como una especie de interés cinegético y económico creciente, que además puede ser clave en el mantenimiento de especies en peligro como el buitre negro o el lobo, evitando en el caso de este último, los conflictos con el ganado. Parece importante, por lo tanto, estudiar los factores determinantes de su distribución y abundancia actual y su evolución histórica desde esta doble perspectiva cinegética y conservacionista. Sin embargo, las estimas precisas y fiables de la densidad son difíciles de alcanzar, pudiendo verse afectadas por determinadas situaciones como la visibilidad del medio, el comportamiento de la especie o la experiencia de los observadores por lo que actualmente son necesarios más estudios científicos que comparen la eficacia, precisión y rendimiento de las diferentes técnicas de censo en especies de especial interés como el corzo.

Para las poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama, apenas existen datos publicados sobre su origen, su variabilidad o su encuadre filogenético dentro del conjunto de las poblaciones españolas y europeas. Además, en numerosas ocasiones las referencias taxonómicas sobre la especie en nuestro país, aún se apoyan en clasificaciones de principios de siglo basadas en la descripción morfológica de unos pocos ejemplares. Las fuertes reducciones sufridas en el Sistema Central en el siglo XIX y primera mitad del siglo XX pueden haber dejado huella en los parámetros genéticos de esta población por lo que poder evaluar el grado de flujo génico y su variabilidad parece clave para la correcta gestión de la población. Pocos estudios han aportado

datos genéticos sobre esta especie incluyendo a poblaciones ibéricas, no existiendo ninguna referencia, hasta el trabajo actual, sobre los parámetros genéticos que caracterizan las especies en la Comunidad de Madrid. Por tanto, evaluar si existen unidades genéticas diferenciadas y analizar la relación entre éstas y su coexistencia en diferentes poblaciones de la Península Ibérica, requieren aún de trabajos más detallados que aborden correctamente la clasificación y el manejo de esta especie en nuestro territorio.

El hecho de que las poblaciones de corzo hayan incrementado su área de distribución y sus abundancias en la Sierra de Guadarrama en los últimos años provoca también que algunos factores de riesgo epidemiológico tales como el contacto con otros ungulados domésticos y silvestres, mayores frecuencias de contacto entre individuos, o situaciones de mayor limitación de los recursos, pueden ganar en importancia. El conocimiento existente sobre el estado sanitario del corzo en la Península Ibérica es muy escaso, particularmente en comparación con el ciervo y prácticamente nulo si nos remitimos al área de estudio. Además, hay que tener en cuenta que, en la última década, la fauna silvestre ha estado relacionada con brotes de enfermedades causantes de diversas emergencias sanitarias en la Unión Europea, como la lengua azul o la influenza aviar, por lo que se pone de manifiesto la importancia que tiene en la actualidad y en el futuro el control sanitario de los animales silvestres. En el caso del corzo cada vez resulta más evidente que las patologías constituyen un factor ecológico igual de importante que la depredación, la disponibilidad de recursos tróficos o la territorialidad. Por estos motivos, sería deseable incrementar los conocimientos actuales sobre el estado sanitario de esta especie, analizando especialmente las interacciones con otros ungulados domésticos, explotados en régimen extensivo en el área de estudio, que *a priori*, favorecen la transmisión de los agentes infecciosos y parasitarios en la población de corzo estudiada, obteniendo así valores de referencia y criterios objetivos que permitan minimizar los riesgos en la gestión y el aprovechamiento de esta especie cinegética, optimizando de forma sistemática el seguimiento sanitario de sus poblaciones.

Aunque el corzo tiene preferencia por los hábitats forestales, su pequeño tamaño y su alta capacidad de adaptación le han facilitado el estar presente en multitud de ambientes diferentes, lo que le confiere unas condiciones excelentes como especie indicadora, tanto del estado de los ecosistemas en los que está presente como de la influencia que el hombre ha ejercido sobre ellos. Las actividades humanas y otros factores como la disponibilidad y calidad del hábitat, la presencia de otros ungulados competidores o el estado sanitario pueden actuar como agentes estresantes en las poblaciones de corzo y en otras muchas especies. Hasta hace pocos años para estudiar el estado fisiológico de estas especies indicadoras se usaban principalmente muestras procedentes del plasma sanguíneo que requerían la captura y manejo del animal produciendo un elevado nivel de estrés, que interfería notablemente en la evaluación de los resultados. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos no invasivos para estudiar este tipo de respuestas de estrés fisiológico mediante la cuantificación de diferentes tipos de hormonas en las heces de estas especies. Esta nueva técnica está siendo utilizada en un número cada vez mayor de mamíferos entre los que se han incluido carnívoros ibéricos como el lobo, marta europea y tejón y también cérvidos como el ciervo o el corzo. El uso de este tipo de técnicas novedosas que evalúan la respuesta de estrés fisiológico, como en nuestro caso en términos de secreción de glucocorticoides en heces, pueden ser una herramienta valiosa para comprenderla ecología de corzo en respuesta a las interacciones humanas, que puede ser de gran valor en la toma de decisiones de gestión de este espacio protegido.

Objetivos

Capítulo 1: el objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de dos técnicas de muestreo a distancia para la estima de las densidades de corzo: los muestreos a pie al atardecer y los muestreos nocturnos en coche con la ayuda de reflectores. Las diferencias entre las dos técnicas sirven de base para plantear la hipótesis de partida: el comportamiento del corzo en respuesta al observador será diferente, pudiendo afectar al cumplimiento de la segunda premisa de estas técnicas de muestreo (los animales se detectan en su

ubicación inicial antes de cualquier movimiento en respuesta a la observador), con posibles implicaciones en la estimación de la densidad. Además, es de esperar que los muestreos nocturnos en coche proporcionen ventajas en términos de costes económicos y minimicen el efecto de algunos de los factores que influyen en la detectabilidad, como la variación de la dirección del viento, el ruido al caminar o la fatiga, aunque desconocemos al plantear esta hipótesis cómo afectará al comportamiento de los corzos el ruido del vehículo.

Capítulo 2: en este estudio se pretende caracterizar los ecotipos de la Sierra de Guadarrama en función de su morfología, crecimiento individual y coloración del pelaje, comparándolos con las tres subespecies descritas sobre estas bases durante el siglo XX en la Península Ibérica, evaluando la validez de este tipo de criterios. La situación de la población, próxima al límite de distribución meridional de la especie, debería mostrar individuos de aspecto homogéneo, lo que no concuerda con los datos previos obtenidos en la población, por lo que es de esperar que los parámetros descritos no sigan un gradiente geográfico determinado. Además se espera que la metodología para el cálculo de la edad a través del recuento de las líneas de crecimiento del cemento dentario, aporte buenos resultados al tratarse de una zona de alta montaña con diferencias estacionales muy marcadas.

Capítulo 3: el objetivo de este capítulo fue contribuir al conocimiento de la filogenia de esta especie en la Península Ibérica a través del análisis molecular de un gran número de muestras de corzo de la Sierra de Guadarrama. Se puede predecir que la situación geográfica del Sistema Central, nexo de unión entre las diferentes poblaciones de la Península y el gran número de ejemplares analizados, pueden desvelar aspectos filogeográficos que no han sido reflejados en anteriores estudios, debido al escaso número de muestras analizadas en esta zona del centro peninsular. Además, también se plantea la hipótesis de que las fuertes reducciones sufridas por la población de

Guadarrama durante los últimos siglos, podrían haber dejado huella en su estructura genética, que el empleo de marcadores microsatélites podría desvelar.

Capítulo 4: en esta investigación se quiso evaluar el estado sanitario de las poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama, con base a las infecciones parasitarias ocasionadas por nemátodos broncopulmonares y gastrointestinales y determinando la prevalencia de anticuerpos frente a 5 agentes infecciosos de especial importancia en sanidad animal [rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), pestivirus (BVD/BD), paratuberculosis (PTB), lengua azul (BT) y *Brucella*], de las que apenas se tiene información para el corzo en la Península Ibérica, a pesar de ser los principales agentes infecciosos de estos rumiantes silvestres. Así, los objetivos concretos planteados en el presente estudio fueron los siguientes: 1) Identificar las especies de nemátodos broncopulmonares, gastrointestinales, trematodos y coccidios presentes en las poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama. 2) Conocer la prevalencia en las muestras fecales y de suero infectadas por endoparásitos y diferentes agentes infecciosos (IBR, BVD, PTB, BT y *Brucella*), respectivamente. 3) Evaluar si los ungulados domésticos, mantenidos en régimen extensivo en el área de estudio, favorecen la transmisión de los agentes infecciosos y parasitarios en la población de corzo estudiada. 4) Analizar la relación de la carga parasitaria (nemátodos broncopulmonares) con el tipo de hábitat y la densidad de corzos.

Capítulo 5: En esta investigación se evaluó la incidencia de variables ambientales como la presencia de ganado doméstico, la caza y la carga de parásitos broncopulmonares en la respuesta de estrés fisiológico del corzo en dos ambientes forestales de la Sierra de Guadarrama, los bosques de pino albar y los robledales. Se espera que los niveles de metabolitos del cortisol fecal sean mayores en los hábitats más degradados, con menor cantidad de alimento para la especie y menores en aquellas muestras fecales recolectadas en zonas

donde no exista competencia con la ganadería extensiva ni molestias ocasionadas por la caza. Además se espera que las muestras con cargas parasitarias más bajas muestren niveles de cortisol más bajos.

CAPÍTULO 1

Horcajada-Sánchez, F. & Barja, I. (2015). Evaluating the effectiveness of two distance-sampling techniques for monitoring roe deer (*Capreolus capreolus*) densities. *Annales Zoologici Fennici* 52: 167-176.

1. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE DOS TÉCNICAS DE MUESTREO DE DISTANCIAS PARA LA ESTIMA DE LAS DENSIDADES DE CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA

Resumen

Los censos de las poblaciones de cérvidos silvestres se han convertido en una prioridad para la gestión. Sin embargo, las estimaciones precisas y fiables de la densidad son difíciles de conseguir, ya que pueden verse afectadas por el tipo de vegetación, el comportamiento de las especies o la capacidad de observación entre otras. Por lo tanto, para obtener estimaciones no sesgadas de la densidad es necesario adoptar métodos de muestreo que cuantifiquen la probabilidad de detectar la especie objeto de estudio. En este capítulo se comparan los resultados de los censos de corzo basados en la distancia de detección, realizados mediante dos técnicas diferentes: los muestreos de distancia a pie al atardecer y los muestreos de distancia nocturnos en coche. Los censos de la población de corzos se llevaron a cabo en la Sierra de Guadarrama (Madrid, España). Los muestreos se realizaron a lo largo de caminos forestales en 10 bosques de pino albar durante el mes de octubre. Las observaciones de los muestreos realizados a pie se ajustaron mejor a las funciones de detección, aunque para realizarlos fueron necesarios más días y más observadores, lo que aumentó el esfuerzo de campo. Los muestreos de distancia nocturnos en coche fueron también una técnica adecuada para el censo de corzo, mejorando el rendimiento en los costes de muestreo, ya que fueron necesarias sólo tres personas durante 6 días para llevarlos a cabo. Sin embargo, es necesario mencionar que las observaciones obtenidas con esta técnica mostraron un desequilibrio en la función de detección en los primeros metros. El modelo fue limitado por el pequeño número de corzos observados en o cerca de la línea de progresión. Esto es una desventaja debido a que una de las premisas en este tipo de muestreos asume que probabilidad de detectar animales disminuye a medida que nos alejamos de la línea de progresión, por lo que esta técnica causó un "hombro" en la distancia cero. Para compensar esta circunstancia, los datos se truncaron a la izquierda en 20 m. Por lo tanto, en situaciones en las que es necesario obtener estimas de las densidades de corzo, la

técnica de muestreo a distancia en coche durante la noche parece ser el método más adecuado debido a su bajo coste, pero la influencia del vehículo sobre la distribución de los corzos y, por tanto, sobre la densidad estimada, debe tenerse en cuenta al llevar a cabo este tipo de metodologías.

1.1. Introducción

A lo largo del siglo pasado, las poblaciones de cérvidos han aumentado significativamente su distribución en América del Norte y en Europa (Gill, 1990), probablemente debido a la recuperación de los hábitats y a la correcta gestión de la caza (Gill et al., 1996; Cederlund et al., 1998). En las últimas décadas del siglo XX el corzo europeo (*Capreolus capreolus*) ha experimentado una expansión en la mayor parte de su área de distribución (Danilkin, 1996). En España, sus poblaciones se han beneficiado de la disminución de la ganadería, el abandono de la agricultura en las zonas de piedemonte y un aumento significativo de las áreas forestales (Horcajada y Fandos, 1999; Acevedo et al., 2005). Por otra parte, la gestión de la caza del corzo ha mejorado considerablemente en las últimas décadas, con temporadas más cortas de caza, cupos limitados, alimentación suplementaria, mejora de la calidad del hábitat y aumento de las reintroducciones (Meriggi et al., 2008).

El interés social en la correcta gestión de esta especie, tanto en España como en el resto de Europa, se ha incrementado sustancialmente (Staines y Ratcliffe, 1987; Cederlund et al., 1998; Radeloff et al., 1999). Por un lado, el aumento de las áreas de distribución y de las densidades en muchas zonas, ha reportado importantes beneficios para la caza, contribuyendo también al turismo de naturaleza en muchas zonas. Por otra parte, especies emblemáticas como el lobo (*Canis lupus*), se han visto favorecidas por la abundancia de corzos como base de su dieta en muchas zonas del norte de España, minimizando considerablemente los conflictos con el ganado (Mattioli et al., 2004; Gazzola et al., 2005; Barja, 2009). Sin embargo, el aumento de la abundancia de corzos también ha provocado un aumento de los daños en las explotaciones forestales y agrícolas (Boh, 1998; Acevedo, 2005). En consecuencia y por todo lo expuesto, los estudios sobre la eficacia de los muestreos en cérvidos han

cochado especial importancia, siendo una herramienta decisiva en la toma de decisiones de gestión, tanto en situaciones de exceso como en las de escasez.

En los muestreos de fauna están involucradas una serie de variables tales como los cambios ambientales (las condiciones meteorológicas, el hábitat, la época del año, etc.), el comportamiento de las especies (distancia de huida y mimetismo) y las aptitudes del observador (Verter, 1985; Bibby y Auckland, 1987; Verner y Milne, 1989; Diefenbach et al., 2003; Norvell et al., 2003). Por tanto, para obtener estimas no sesgadas de la densidad es necesario adoptar métodos de muestreo que cuantifiquen la probabilidad de detectar las especies objeto de estudio, teniendo presente las variables anteriormente mencionadas (White, 2005).

Los muestreos basados en la distancia de detección (Thomas et al., 2002; Buckland et al., 2004) son ampliamente utilizados debido a su facilidad de uso y la disponibilidad de software libre, siendo consideradas técnicas relativamente baratas para la estimación de densidades de poblaciones de fauna a través de modelos basados en la probabilidad de detección. Estos métodos se basan en la distancia a la que los animales se detectan en un lado y otro de la línea por la que el observador progresa. Así, las tres premisas básicas en las que se basan estas técnicas son las siguientes (Buckland et al., 2001): (1) los animales situados en la línea de progresión se identifican con probabilidad 1, (2) los animales se detectan en su ubicación inicial, antes de cualquier movimiento en respuesta al observador, y (3) las distancias desde la línea de progresión a los animales se miden con precisión. El primero y el último de estos supuestos dependen del diseño de muestreo, el equipamiento y el rigor del observador, por lo tanto, pueden ser controlados por el personal responsable del censo. Sin embargo, el segundo supuesto depende de las respuestas de los animales al observador. La habilidad del observador para no ser detectado, pudiera también influir en este supuesto, por lo que contar con personas cualificadas es un requisito prioritario.

Los muestreos basados en la distancia de detección se han mostrado como una técnica fiable en las estimas de densidad, aunque es necesario tener en cuenta otros factores tales como los ritmos de actividad de animales y tipo de hábitat (Buckland et al., 2001). Dado que estas técnicas ofrecen soluciones adecuadas para los muestreos de fauna, son elegidas a menudo por los investigadores para estudiar un grupo tan grande y variado de animales como los ungulados (Focardi et al., 2002; Ward et al., 2004; Liu et al., 2008; Wegge y Storaas, 2009; Schmidt et al., 2012).

Entre los factores que influyen en la detectabilidad de los ejemplares, podemos destacar las limitaciones del observador (fatiga, visión, destreza para moverse en silencio), las variables del hábitat (cobertura vegetal, relieve), la velocidad de muestreo, las condiciones meteorológicas (dirección e intensidad del viento, lluvia), el tipo de suelo sobre el que caminamos (pedregoso, con hojas secas, etc.) y las variables relacionadas con la especie (sexo, tamaño, comportamiento, coloración) (Burnham y Anderson, 1984; Anderson et al., 2001). En este aspecto resulta obvio que la experiencia de los observadores aumenta significativamente las tasas de detección de animales, por lo que las habilidades visuales y auditivas son imprescindibles para distinguirlos. El nivel de formación y la experiencia determinarán el grado de desarrollo de estas habilidades (Gregori et al., 2002). Por otro lado, la estructura de la vegetación también afecta a la detección de animales. En este aspecto, Gill et al. (1997) indicaron que la falta de vegetación y una mayor visibilidad proporcionan estimaciones más precisas de la densidad de una especie. Factores relacionados con los animales, incluyendo el tamaño, el color o la movilidad, también puede llevar a que un ejemplar sea más detectable. En esta aspecto, Focardi et al. (2002) mencionan en su estudio que las diferencias de sexo (el tamaño del animal, las diferencias en el comportamiento, la movilidad, la distancia de huida, la segregación del hábitat y el tamaño del grupo) pueden afectar detectabilidad.

Actualmente son necesarios estudios más estudios científicos que comparen la eficacia, las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas de muestreo a distancia

en las poblaciones silvestres, y sobre todo en especies de caza con importantes repercusiones económicas como los ungulados.

1.2. Material y métodos

1.2.1. Ámbito de estudio

El estudio comparado de dos técnicas de muestreo a distancia fue desarrollado en 10 bosques de repoblación de pino albar (*Pinus sylvestris*) en la Sierra de Guadarrama, en octubre de 2007. Las superficies de estos pinares oscilaron entre 292,6 a 2.513,8 ha (media= $1410,0 \pm 692,3$ ha) (Figura 17). Estos bosques de pinos representan la principal vegetación del piso oromediterráneo Guadarrámico (Rivas-Martínez, 1987) y pertenecen a montes de utilidad pública de la Comunidad de Madrid. Actualmente 5 de ellos están dentro del territorio del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (Fig. 17).

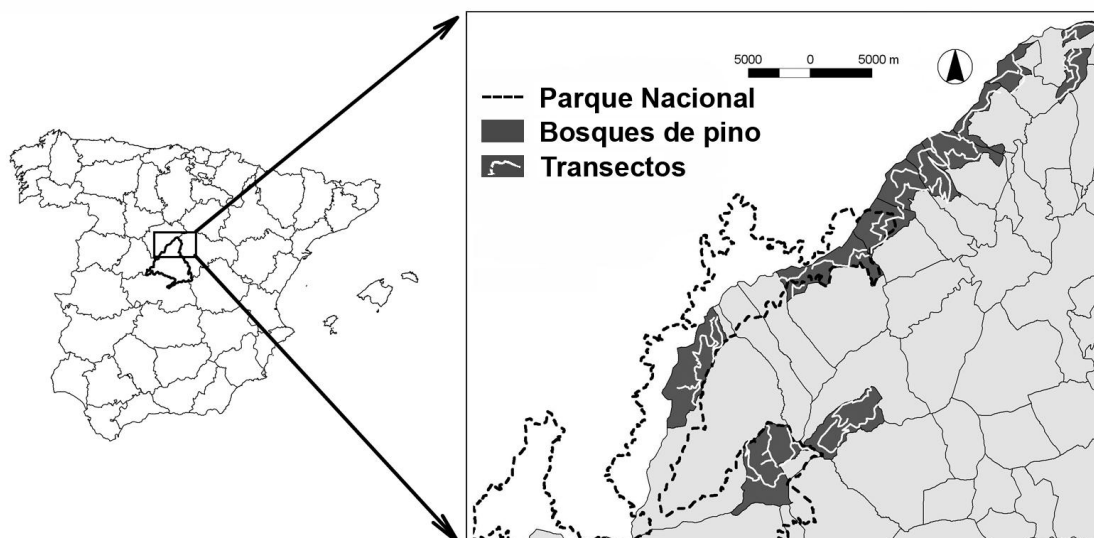


Figura. 17. Localización del área de estudio en la Península Ibérica en el que se aprecian los bosques de pino albar y la ubicación de los transectos sobre los que se realizaron los muestreos de distancia a pie y en coche.

El paisaje de montaña de la zona de estudio se compone de bosques, matorrales y pastizales. Los bosques de pino se encuentran entre los 1.200 y 1.900 m. de altitud y muestran un sotobosque con especies como el piorno serrano (*Cytisus*

oromediterraneus), el enebro común (*Juniperus communis*) o el cambroño (*Adenocarpus hispanicus*), alternándose con algunas otras especies como el acebo (*Ilex aquifolium*) y el roble melojo (*Quercus pyrenaica*) (Rivas-Martínez, 1987).

La abundancia de corzos en el ámbito de estudio está directamente relacionada con el medio forestal (Sáez-Royuela y Tellería, 1991). En estas zonas se han encontrado densidades similares de corzos en los bosques de robles y pinos, disminuyendo significativamente en los hábitats de matorrales supraforestales o en el fondo de valle (Horcajada, 2007). La variación estacional en la estructura gregaria del corzo es consistente con las tendencias observadas en otras poblaciones (Delibes, 1996), que muestran el máximo aislamiento en primavera y verano y reagrupamiento durante el otoño y el invierno.

1.2.2. Muestreos de distancia a pie y en coche

Para estimar la densidad de corzos en el ámbito de estudio, se establecieron itinerarios de censo que discurrían por pistas y caminos forestales de los bosques de pinar descritos (Fig. 17). La recopilación de observaciones de esta especie, se vio favorecida por sus hábitos nocturnos y crepusculares (Ellenberg 1978; Sáez-Royuela et al., 1989; Chapman et al., 1993) y por un patrón de actividad circadiana polifásico (Delibes, 1996; Mateos-Quesada, 2002). La distancia entre los diferentes itinerarios osciló entre los 250 y 500 m., siendo el ancho de las pistas y caminos siempre inferior a 4 m. Los muestreos fueron realizados a través de dos diferentes técnicas: a pie al atardecer y en coche por la noche con ayuda de reflectores.

Los itinerarios nocturnos en coche se llevaron a cabo durante 6 días, con un total de 179 km recorridos en 16 transectos. La longitud de los transectos varió entre los 2,8-39,3 km (media= 11,2±8,8 km), cubriendo todo el área de estudio e incluyendo todas las pistas y caminos accesibles en coche. Los recorridos se llevaron a cabo una sola vez, dentro del intervalo horario de 21:00 p.m. a 5:00 a.m. Los muestreos no se realizaron en noches con lluvia y niebla, evitando así cualquier sesgo producido por las condiciones meteorológicas. El equipo de muestreo estaba formado por un conductor,

que también participaba en las observaciones, y dos observadores, colocados en el asiento trasero del vehículo. El vehículo, un todoterreno, circuló siempre a una velocidad entre 10-15 km/h. Los observadores miraban por las ventanas abiertas a ambos lados de los caminos utilizando un reflector de mano cada uno (Interfase, luminosidad: 1.000.000 candelas, potencia: 100W). En la mayoría de los casos, los animales observados fueron identificados por los tres observadores.

Por su parte, los itinerarios a pie, se realizaron durante 21 días, recorriendo igualmente 179 km, aunque en este caso distribuidos en 64 transectos. La longitud de los transectos varió entre 2,1 km y 3,6 km (media= $2,7 \pm 0,4$ km), realizándose por pistas y caminos forestales al atardecer, dentro del intervalo horario de 19:30 p.m. a 21:00 p.m. La dirección del viento se tuvo en cuenta durante los recorridos a pié, no realizándose dichos recorridos cuando las condiciones meteorológicas favorecían la detección del observador por parte de los animales. En cada recorrido participó un único observador, que caminaba con sigilo a una velocidad de 2 km/h. En los 64 itinerarios a pie realizados, participaron 6 observadores con experiencia en este tipo de estudios, incluyendo los tres que realizaron los itinerarios en coche.

Todos los observadores iban provistos de prismáticos y en la mayoría de los casos con telémetro (LeicaGeovid 8 x 42 o similar) para facilitar la identificación de los animales y para medir la distancia de observación, tanto en los muestreos a pie como en los muestreos nocturnos en coche. En ambas técnicas de censo, en cada contacto (cada vez que se detectó un corzo o un grupo de corzos) se registró el número de ejemplares del grupo, su comportamiento durante la observación (en movimiento o inmóvil) y la dirección de huida. En los muestreos nocturnos en coche, cuando se observó un corzo, el conductor detuvo el vehículo para detectar de forma precisa la distancia perpendicular al contacto. Además, en todos los casos se registraron las coordenadas de cada observación a través de un GPS (modelo Thales Mobile Mapper).

1.2.3. Análisis de datos

Según Buckland et al. (2001), muy poca eficiencia se pierde mediante la agrupación de los datos de avistamientos en intervalos, por lo que para lograr un mejor ajuste a las funciones de detección, los avistamientos se agruparon en intervalos de distancias perpendiculares.

Para las estimaciones de densidad, se incluyeron sólo los contactos entre 0 y 150 m ($n = 125$) ya que los avistamientos en distancias mayores de 150 m se excluyeron del análisis debido a la dificultad de estimar con precisión la distancia perpendicular. En este aspecto, Buckland et al. (2001) recomiendan el truncamiento de datos para eliminar los valores atípicos y mejorar el modelo adecuado. Además, si la probabilidad de detección de los animales en o cerca de la línea de progresión del observador se reducía considerablemente (<1), pero no ocurría lo mismo en intervalos de distancia paralelos, los datos de probabilidad de detección máxima pudieron estimarse truncando las observaciones a la izquierda (Pollock & Kendall, 1987; Quang y Lanctot, 1991).

En general, la estimación de las densidades se realizó a través del ajuste de las distancias perpendiculares a una función de detección. La función de detección, $g(y)$, es la probabilidad de detectar un ejemplar a una distancia dada. Mediante la diferencia entre el número esperado de ejemplares detectados y el número observado, se pueden evaluar la proporción de los ejemplares detectados (Buckland et al., 1993; Thomas et al., 2002). Para una estimación adecuada de la densidad, fue necesario un número relativamente grande de observaciones de corzo, al menos entre 60-80 ejemplares, de acuerdo con Buckland et al. (2001), aunque otros autores estiman este número en 40 individuos (Burnham et al., 1980).

Los datos fueron analizados utilizando el software Distance 6.0 (Thomas et al., 2010) con el complemento para análisis de muestreos con múltiples covariables (MCDS). Para el tratamiento de los datos del muestreo, la selección del modelo, el análisis final y la interpretación de los resultados se siguieron las directrices descritas

por Buckland et al. (2001). El programa Distance 6.0 permitió utilizar varias funciones de detección y series de expansión para modelar las probabilidades de detección de los ejemplares. Para cada técnica de muestreo (en coche/a pie), se utilizaron las siguientes funciones (y series de expansión): semi-normal (coseno o polinomio de Hermite), las funciones de tasa de riesgo “Hazard” (coseno o polinomio simple), la función exponencial negativa (coseno) y uniforme (coseno) o también llamada series de Fourier. Un análisis MCDS se llevó a cabo para probar los efectos de las dos técnicas de muestreo en la probabilidad de detección, con un único modelo implementando la estratificación vía post-estratificación “*post-stratification*” (Buckland et al., 2001) mediante la inclusión de la covariable “técnica de muestreo” (a pié/en coche). Este método de análisis de los datos es recomendado para muestreos estratificados basados en datos no geográficos (Marques y Auckland, 2003) como en este caso. Para seleccionar los modelos que mejor se ajustaron a los datos observados se utilizó el criterio de información de Akaike con la corrección de pequeños tamaños de muestras (AIC) (Buckland et al., 2001), y la bondad de la prueba de ajuste (χ^2).

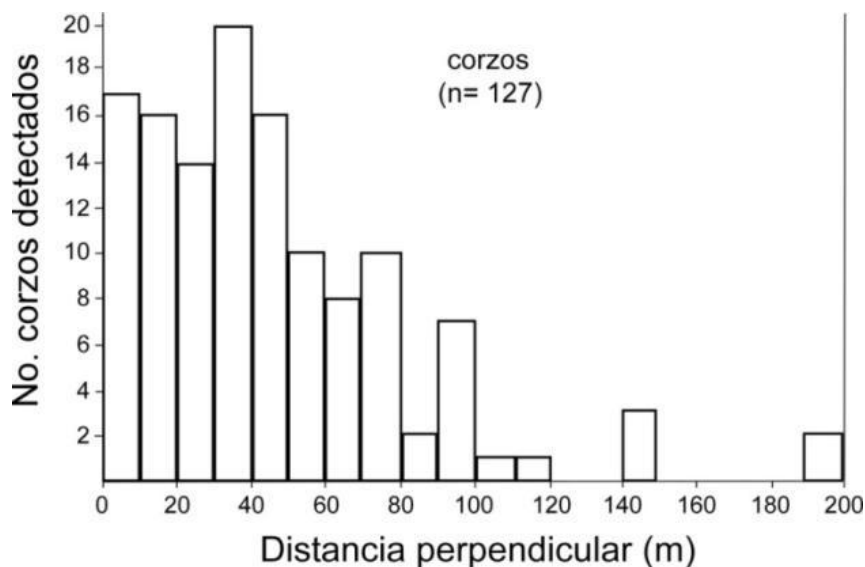


Figura 18. Histograma y distancias de detección obtenidas en los muestreos de corzo en bosques de pino albar de la Sierra de Guadarrama.

1.3. Resultados

1.3.1. Muestreo general usando la post-estratificación “post-stratification”

Durante los recorridos se observaron 127 corzos en 108 grupos diferentes (Fig. 18). El tamaño medio de grupo fue de $1,18 \pm 0,42$. El 71,6% de los corzos fueron vistos en solitario y el 23,6% se observaron en grupos de dos ejemplares. Sólo el 4,7% de los corzos se observaron en grupos de más de 2 ejemplares. La función de tasa de riesgo con ajuste al coseno “Hazard/cosine” fue el modelo que mejor se ajustó a todos los contactos de corzo obtenidos en los muestreos de distancia generales (AIC= 287) (Tabla 1). La densidad media de corzos (número de corzos/100 ha) obtenida con los muestreos de distancia generales fue de $1,91 \pm 0,28$ (CV%= 14,84, IC 95%= 1,42 a 2,56) (Tabla 1, Fig. 19A).

1.3.2. Muestreo de distancias en coche “car line-transect”

Durante los itinerarios nocturnos en coche se observaron 77 corzos en 58 grupos diferentes. El tamaño medio de grupo fue de $1,33 \pm 0,54$ individuos. El 53,2% de los corzos fueron vistos solos y el 38,9% se observaron en grupos de dos ejemplares. Sólo el 7,7% de los corzos se observaron en grupos de más de 2 ejemplares. Tras el análisis de los datos se observó que el modelo estaba limitado por el escaso número de corzos observados en o cerca de la línea de progresión (Fig. 19B), por lo que se optó por truncar los datos a la izquierda, evitando los primeros 20m (Fig. 19C). La densidad media de corzos (número de corzos/100 ha) para los datos truncados a la izquierda fue de $3,13 \pm 0,51$ (CV%= 16,4, IC 95%= 2,26 a 4,34) (Tabla 1, Fig. 19C), mientras que en los datos sin truncar se estimó una densidad media de $2,65 \pm 0,36$ (CV%= 13,7, IC 95%= 2,01 a 3,48) (Tabla 1, Fig. 19B).

El 76,0% de los corzos permanecieron quietos durante la observación y el 82,0% no cambiaron su comportamiento ante la presencia del coche. De los corzos observados en el intervalo de 0-20m (n= 9) tres huyeron corriendo, tres continuaron caminando, uno estaba encamado y dos permanecieron quietos. Todos los corzos observados a distancia 0 huyeron corriendo en la observación (n= 3).

1.3.3. Muestreo de distancias a pie “walk line-transect”

Durante los muestreos de distancia a pie se detectaron 50 corzos, no observándose más de un ejemplar en cada contacto. La densidad media de corzos (número de corzos/100 ha) fue de $1,43 \pm 0,23$ ($CV\% = 16,40$, $IC\ 95\% = 1,03$ a $1,99$) (Tabla 1, Fig. 19D). El 78% de los corzos estaban en movimiento durante la observación y todos los animales observados modificaron su comportamiento frente al observador.

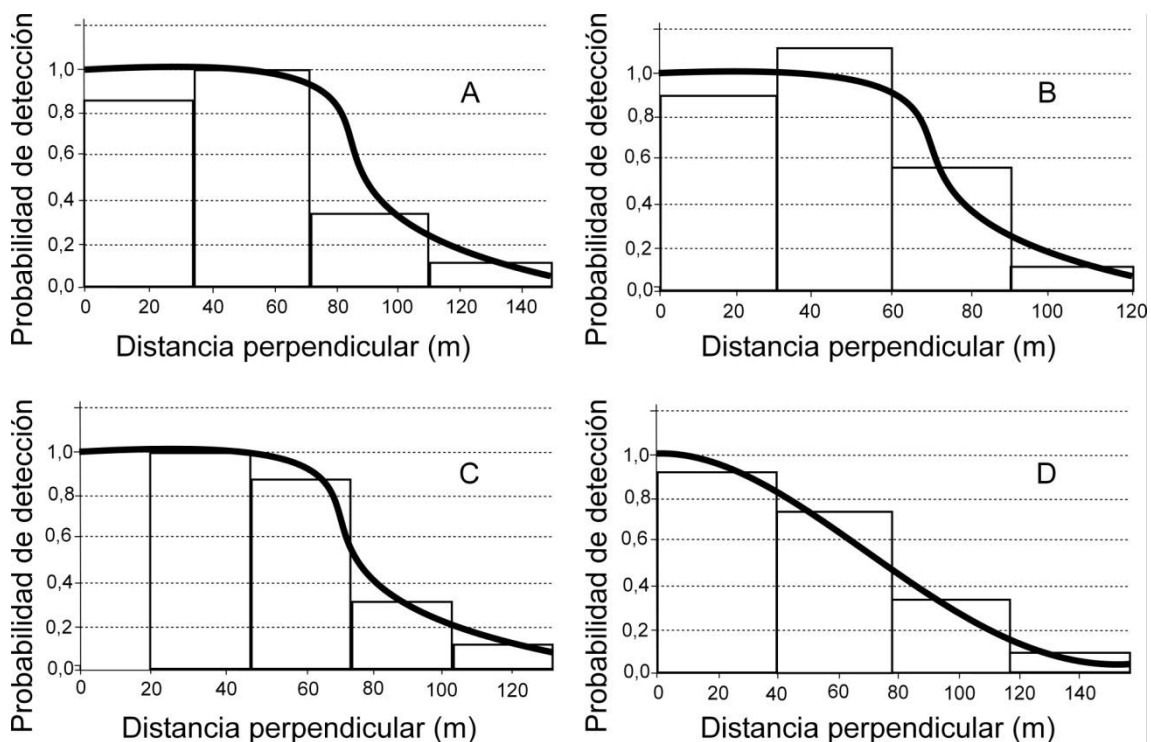


Figura 19. Probabilidad de detección de corzos en bosques de pino albar de la Sierra de Guadarrama. Los histogramas indican la distribución de los avistamientos y la curva la función de detección del modelo con mejor ajuste para cada tipo de muestreo: (A) muestreos lineales generales con post-estratificación, (B) muestreos de distancia nocturnos en coche, C: muestreos de distancia nocturnos en coche con las observaciones truncadas en los primeros 20 m, D: muestreos de distancia a pie al atardecer. Para las técnicas A, B y C en los modelos se usó la función de riesgo ajustada al coseno “Hazard-cosine” y para D las series de Fourier con la función uniforme ajustada al coseno.

1.3.4. Comparación de las dos técnicas de muestreo

La densidad de corzos estimada con los datos truncados a la izquierda en los muestreos de distancia nocturnos realizados en coche fue un 18,1% más alta que la obtenida en los mismos muestreos pero con los datos sin truncar y un 118,0% más elevada que en los muestreos de distancia a pie. Durante los muestreos en coche se

observaron 0,43 corzos/km recorrido, mientras que en los muestreos a pie 0,24 corzos/km. El 76,0% de los corzos observados en los muestreos en coche estaban parados al producirse el contacto, mientras que en los muestreos a pie sólo un 22% de los ejemplares estaban quietos. En los muestreos en coche, sólo el 53,2% de los corzos se observaron solos, mientras que en los muestreos a pie se observaron todos los ejemplares solos.

Tabla 1. Densidades de corzo en el área de estudio con diferentes técnicas de muestreo a distancia. En todos los casos el mejor ajuste fue obtenido con la función “hazard-cosine”, excepto para los muestreos de distancia a pie en los que el mejor ajuste se consiguió con las series de Fourier (función uniforme ajustada al coseno). La tabla muestra también para cada técnica y para cada función evaluada, intervalos de confianza (CI), AIC valores, error estándar (SE), coeficientes de variación (CV) probabilidad asociada con la bondad de ajuste del test (GOF χ^2 -p value).

Densidades de corzo estimadas con las diferentes técnicas de muestreo a distancia							
Técnica de muestreo a distancia	Función del modelo	Densidad de corzo (indiv. Km ⁻²)	95%CI	AIC	CV	SE	p
Muestreo general usando “post-stratification”	Hazard/coseno	1,91	1,42-2,56	287	0,14	0,28	-
	Seminormal/coseno	2,21	1,64-2,97	290	0,15	0,33	-
Muestreo de distancias en coche	Hazard/coseno	2,65	2,01-3,48	191	0,13	0,36	0,48
	Seminormal/coseno	3,15	2,33-4,25	193	0,15	0,47	0,13
	Uniforme/coseno	2,78	1,85-4,18	192	0,21	0,58	0,14
Muestreo de distancia en coche truncado a la izquierda	Hazard/coseno	3,13	2,26-4,34	155	0,16	0,51	0,98
	Seminormal/coseno	4,56	3,20-6,50	156	0,18	0,82	0,27
	Exp-neg/coseno	4,82	0,38-61,03	157	2,01	9,69	0,16
Muestreo de distancias a pie	Uniforme/coseno	1,43	1,03-1,99	117	0,16	0,23	0,99
	Hazard/coseno	1,35	0,87-2,07	119	0,22	0,29	0,75
	Seminormal/coseno	1,48	1,01-2,14	117	0,19	0,28	0,98

1.4. Discusión

En consonancia con el resto de Europa (Danilkin, 1996), las poblaciones de corzo del centro de la Península Ibérica están aumentando su área de distribución durante las últimas décadas (Acevedo et al., 2005; Horcajada, 2007). Por estas razones, ya

desde hace varios años el interés de las administraciones en la correcta gestión de la especie se ha visto impulsado notablemente (Cederlund et al., 1998; Duncan, 1998; Radeloff et al., 1999). El uso de métodos fiables para la estima de las abundancias en vertebrados es la base de una buena gestión (Barea-Azcón et al., 2007). Sin embargo, existe cierto desacuerdo respecto a la exactitud de las estimas con los diferentes métodos de censo, especialmente con los basados en los muestreos de distancias (Álvarez, 1988; Gill et al., 1997), aunque las bondades de ajuste de este método han sido destacadas por algunos autores. Así, la eficacia del método en el estudio de la abundancia del corzo en zonas forestales ha sido evaluada por en numerosos estudios (Gaillard et al., 1993; Ward et al., 2004; Focardi et al., 2005). También, Smart et al. (2004) indicaron que este método aportaba datos tan buenos o mejores que otras técnicas, siendo frecuentemente utilizados para censar ungulados por varios autores (Marques et al., 2001; Walter y Hone, 2003).

En el presente estudio las densidades medias obtenidas se sitúan dentro de los valores mínimos ofrecidos por otros autores para las poblaciones de corzo en España y en el resto de Europa (Costa, 1992; Aragón, 1993; Mateos-Quesada, 2005), aunque tanto en Europa (Cederlund, 1981) como en España (Mateos-Quesada, 2005) existen referencias de densidades bajas en bosques de coníferas. Los bosques de pinar de repoblación del área de estudio, presentan poca diversidad arbustiva y un sotobosque muy mermado debido fundamentalmente a los tratamientos de lucha contra incendios forestales (Bailón et al., 2008), siendo negativamente seleccionados por los corzos frente a los bosques de frondosas con buen estrato arbustivo (Pedroli et al., 1981; Prior, 1995; Mateos-Quesada, 2005). Esto, sumado a la competencia con el ganado, parecen ser las causas de esta baja densidad de corzo, tal y como han observado otros autores en éste y otros ungulados silvestres (Fuller, 1990; San José et al., 1997).

El uso de diferentes técnicas para el muestreo de distancias (p. ej. censos a pie vs. en coche) supone, en ocasiones, una diferencia considerable en su eficacia. Además de influir en las estimas de la densidad o en el comportamiento de la especie también afecta a los costes y al rendimiento del muestreo, aspectos claves para cualquier

proyecto de gestión de fauna silvestre. Aunque los muestreos a pie aportaron mejores ajustes en las funciones de detección, mostrando una distribución uniforme en ambos lados de la línea de progresión, los muestreos nocturnos en coche cumplieron mejor la premisa con respecto a la respuesta del animal al observador (Buckland et al., 2001): la mayoría de los corzos estaban inmóviles cuando se detectaron y casi ninguno cambió su comportamiento durante la observación. Por el contrario, esto no ocurrió en los muestreos a pie, en los cuales la mayoría de los corzos estaban en movimiento cuando fueron detectados. Una circunstancia que resulta relevante en el uso de este tipo de metodologías es que el comportamiento de los ejemplares en los primeros metros desde la distancia cero, puede condicionar los resultados del muestreo, violando uno de las premisas claves (Ward et al., 2004). En los muestreos realizados en coche, los corzos se han mostrado mucho más permisivos frente al observador que en los recorridos a pie, aunque los animales han evitado los primeros metros a un lado y a otro del camino por donde transitaba el vehículo, causando un desajuste en las funciones de detección en los primeros metros. Este hecho ha sido constatado también en otros estudios (Heydon et al., 2000; Sadler et al., 2004). Gill et al. (1997) también observaron que los corzos evitaban los caminos por la noche en repuesta a la presencia de vehículos desde los cuales disparaban los furtivos. En nuestro estudio, es posible que los corzos se apartasen del camino simplemente al escuchar el motor del coche, evitando un contacto directo con el vehículo, ya que no se tiene constancia en la zona de casos de furtivismo desde los coches. Por lo tanto, debido al pequeño número de corzos observados a lo largo o cerca de la línea de progresión, se consideró adecuado manipular los datos de las observaciones truncando los primeros 20 m (Buckland et al., 1993). Es imposible estimar el efecto de la manipulación cuando se desconoce la densidad real, aunque se podrían valorar dos posibles situaciones: la primera, que el trucar los datos se pudiera dar lugar a una subestimación, ya que es probable que no se detectaran todos los animales a partir de los primeros 20 m, sobre todo cuando los bosques son densos; y la segunda, si un área de mayor concentración de animales se utiliza como distancia cero, esto podría conducir a una sobreestimación, especialmente si los corzos seleccionan positivamente este margen

entre las carreteras y bosques, como se describe por Ward et al. (2004) en su estudio o si los ejemplares desplazados por la presencia del vehículo se han quedado observando a partir de esos primeros 20 m. A pesar de que no se observan picos exagerados en las frecuencias observadas dentro del intervalo de la primera distancia (20-45 m), mostrando una distribución homogénea de corzo, la densidad de corzos estimada con datos truncados a la izquierda fue mayor que la obtenida a partir de la estimada a partir de datos no-truncados, por lo que es posible que pudiera existir una sobreestimación.

Aun así, en los muestreos en coche, los factores dependientes del observador como la fatiga, el sigilo para evitar la detección, la perspicacia visual para detectar los animales y el olor emitido, descrito por algunos autores como causas de imprecisión y pérdida de contactos en los muestreos a pie (Burnham y Anderson, 1984; Anderson et al., 2001), se reducen al mínimo. La fatiga del observador, el ruido al caminar y el olor corporal se reducen cuando se muestrea desde el coche. Además, el uso de reflectores mejoró la capacidad visual del observador al facilitar la observación de los corzos debido al brillo de sus ojos al reflejar la luz del foco, gracias al "*tapetum lucidum*". En este sentido, el hecho de que en ungulados el reflejo de los ojos sea azul (Martin, 1990), facilitó bastante la detección de ejemplares ocultos detrás de la vegetación o encamados, evitando confusiones entre corzos y otros mamíferos como los carnívoros, con brillos de tonalidades diferentes. Con respecto a los factores dependientes de las variables ambientales (condiciones meteorológicas, velocidad de progresión por el recorrido, cobertura de vegetación, tiempo de censo) (Burnham y Anderson, 1984; Anderson et al., 2001), la técnica de los recorridos nocturnos en coche solventó algunos problemas que plantean los recorridos a pie. Así, el vehículo evitó que el observador fuera detectado por los animales debido a las variaciones en la dirección del viento; además, fue más fácil mantener y controlar la velocidad durante el censo (15 km/h). En relación con las variables relacionadas con la especie a censar, como es el comportamiento del ejemplar al localizar al observador, en este estudio se ha demostrado que la mayoría de los corzos localizados desde el coche no alteraban su comportamiento al detectar al observador. Todos estos condicionantes previamente

mencionados pudieron influir en una subestimación de la densidad de la población en los muestreos a pie, con un número elevado de ejemplares que huyeron antes de ser vistos por el observador. El hecho de que durante los recorridos nocturnos en coche la mayoría de los corzos mantuvieran su comportamiento durante la observación apoya la segunda premisa básica en la que están basadas estas técnicas: los ejemplares se detectan en su ubicación inicial, antes de cualquier movimiento en respuesta al observador (Buckland et al., 2001).

En términos de tiempo empleado y coste-eficacia, los muestreos realizados en vehículo fueron más rentables que los realizados a pie. Esta diferencia se basa principalmente en el número de kilómetros por día de trabajo y el número de observadores necesarios para su realización. La velocidad del vehículo, muy superior que la de los observadores a pie, y la amplitud del intervalo horario disponible (21:00 p.m. hasta las 05:00 a.m.), permitió que el número de días requeridos para completar el muestreo se redujera considerablemente. Además, las horas propicias para la detección de ejemplares, no tenían la limitación de la falta de luz, pudiendo muestrear en un intervalo amplio de tiempo, entre el amanecer y el atardecer. Gracias a la velocidad del vehículo, el muestreo pudo llevarse a cabo durante más tiempo, por lo que el número de días requeridos para completar el muestreo se redujo significativamente.

Por último, sobre la base de las diferencias entre las dos técnicas de muestreos de distancia utilizadas aquí, llegamos a la conclusión de que el muestreo en coche con reflectores favorece la detección de los animales, pero implica un desequilibrio en las observaciones de corzos en los primeros metros, lo que causa un desajuste en las funciones de detección ocasionando una imprecisión en los resultados que puede solventarse. Por lo tanto, las ventajas y limitaciones de cada técnica de muestreo a distancia se deben tomar en cuenta al calcular las estimaciones de la densidad de manera fiable en esta especie.

CAPÍTULO 2

Horcajada-Sánchez, F. & Barja, I. (in re-revision). Local ecotypes of roe deer populations (*Capreolus capreolus* L.) in relation to morphometric features and fur colouration in the centre of the Iberian Peninsula. *Polish Journal of Ecology*.

2. ECOTIPOS LOCALES DE CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, DIMORFISMO SEXUAL Y COLORACIÓN

Resumen

La amplitud del área ocupada por las poblaciones de corzo y la diversidad de ambientes que ocupa, determinan la existencia de diferentes "ecotipos" o formas locales que se diferencian tanto en la coloración del pelaje como en la morfología. Con el fin de caracterizar las poblaciones de la Sierra de Guadarrama, en el centro de la Península Ibérica, se han examinado las características biométricas, el peso y la coloración del pelaje de 154 ejemplares de corzo (*Capreolus capreolus*) en función de su edad y el sexo. Para determinar la edad de los corzos, se ha recurrido al análisis del cemento dentario de los incisivos (I_1) observando las líneas de crecimiento. El resto de datos individuales (tamaño corporal, sexo y coloración del pelaje) se obtuvieron en el campo, a partir de animales cazados en el área de estudio. En los ejemplares adultos, el peso corporal promedio en machos fue significativamente mayor que en las hembras, ($p: 0,03$) siendo estos rangos de peso similares a los de la Península Ibérica y a los del resto de Europa. Los datos biométricos se relacionaron positivamente con la edad del individuo, pero sólo se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en el perímetro torácico ($p: 0,003$). La descripción de la coloración del pelaje en los ejemplares muertos analizados mostró una alta variabilidad con cuatro ecotipos diferentes durante la muda de verano, no encontrándose diferencias significativas en el tamaño corporal entre los ejemplares con diferentes mudas de verano. Sin embargo, la alta variedad de coloraciones contrasta con lo que sería esperable para una población en el límite meridional de distribución de la especie, por lo que la existencia de refugios del Pleistoceno en las montañas centrales de la Península Ibérica y la llegada de corzos de diferentes zonas parece haber proporcionado una gran variedad de ecotipos en relación con la coloración de la piel en las poblaciones de montañas de Guadarrama.

2.1. Introducción

En los vertebrados los valores biométricos de cada individuo se ven afectados por muchas variables como la genética, la nutrición, los factores que regulan el crecimiento de los tejidos, las hormonas y todos los aspectos ambientales que influyen en el crecimiento de los animales. (Kirkpatrick, 1980; Sober, 1984). En los cérvidos, en general, hay muchos factores dependientes en gran medida de la densidad poblacional que están directamente involucrados en la regulación natural de la población y en sus características morfológicas. La competencia intra e interespecífica, los factores que regulan la capacidad de carga del medio y las estrategias reproductivas, pueden provocar variaciones en el aspecto externo y la morfología (Sägesser, 1966; Begon et al., 1988; Fandos, 1994; Pérez-Barbería et al., 2002). El comportamiento territorial exhibido por el corzo (Bideau et al., 1993; Delibes, 1996) contribuye a los fenómenos de autorregulación de la población, influyendo directamente en los procesos de reproducción, mortalidad y crecimiento de los jóvenes (Prior, 1995), expresando considerablemente su relación con el medio a través de modificaciones físicas de los individuos, reflejadas en mayor o menor grado en el tamaño corporal, el peso (Mateos-Quesada, 1998; Pettorelli et al., 2002; Toigo et al., 2006; Czyżowski et al., 2009) y la coloración (Stoner et al., 2003). Este último parámetro es también un indicador directo de la adaptación al entorno por parte de la especie.

Algunos estudios sobre morfología externa y coloración, se han utilizado para obtener datos sobre su taxonomía (Stoner et al., 2003; Kulak y Wajdzik, 2009), describiendo la apariencia de los ejemplares de una población como base para el análisis de la variabilidad individual en función de la edad, el sexo y la ubicación geográfica (Costa, 1995; Mateos-Quesada, 1998). Estos aspectos han sugerido durante el siglo XX diferentes grados de subespeciación para las poblaciones de la Península Ibérica, con la descripción de tres subespecies sobre la base de su alta variabilidad morfológica (Lister et al., 1998): *C. c. canus* (Miller, 1910) en el norte de España, *C. c. decorus* (Cabrera, 1916) en el noroeste de España y, sobre todo, *C. c. garganta* (Cabrera, 1916; Meunier, 1983) en el sur de España, considerada como una población

relicta de corzos ibéricos. Aunque esta alta variabilidad de ecotipos y aspectos del corzo en la Península Ibérica es evidente, no parece corresponder con ningún gradiente específico (Braza et al., 1994; Fandos 1994; Costa, 1995), respondiendo más a la influencia de las condiciones climáticas, ecológicas y geográficas, la capacidad de carga del medio ambiente y la alimentación (Delibes, 1996).

En general, el tamaño y el peso corporal de los animales varían con la edad (Angibault et al., 1993) y dependen en gran medida las condiciones de vida para su desarrollo y especialmente de la disponibilidad de recursos alimentarios (Hanus y Fiser, 1981; Sägeser, 1996). Además, los rasgos que determinan la condición individual pueden variar a través de las estaciones del año, dependiendo de la deficiencia de nutrientes, del estado fisiológico y de las enfermedades (Holanda, 1992; Sugar, 1997; Sams et al., 1998).

A pesar de lo comentado para las poblaciones de la Península Ibérica, en el conjunto general de la especie en Europa, a grandes rasgos los corzos europeos si cumplen con el principio de Bergman (Bergmann, 1847) en relación con el tamaño del cuerpo, con tamaños más grandes hacia el norte y más pequeños en las latitudes del sur. Por lo tanto, el corzo de Suecia (Essen, 1966) y el Cáucaso tiene tamaño y peso significativamente mayor que la media de las especies (Danilkin, 1996), mientras que los de las montañas andaluzas del sur de España se encuentran entre los más bajos (Aragón, 1993). Aun así, también en otros países se encuentran excepciones como el corzo de Gran Bretaña, que muestra una disminución en el tamaño de los ejemplares a medida que las poblaciones se sitúan más al norte (Hewison, 1993).

El amplio ámbito de distribución de las poblaciones de corzo y la diversidad de ambientes que ocupa, determinan pues la alta variabilidad morfológica y ecológica de la especie (Fruzinski et al., 1982; Fandos y Reig 1993; Fandos 1994) que también se ha visto reflejada en la aparición de diferentes coloraciones del pelaje (Aragón, 1993), parámetro clave en estrategias como el mimetismo, la comunicación y la termorregulación (Stoner et al., 2003).

2.2. Material y métodos

2.2.1. Ámbito de estudio

El trabajo de campo de este estudio se llevó a cabo entre los años 2000 y 2010 en 27 localidades de la Sierra de Guadarrama, en el centro de la Península Ibérica (Fig. 20). Actualmente 6 de ellas están dentro del territorio del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama.

El paisaje de montaña de la zona de estudio se compone de bosques, matorrales y pastizales. Los bosques de pino albar (*Pinus sylvestris*) se encuentran entre los 1.200 y 1.900 m. de altitud y muestran un sotobosque con especies como el piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*), el enebro común (*Juniperus communis*) o el cambroño (*Adenocarpus hispanicus*), alternándose con algunas otras especies como el acebo (*Ilex aquifolium*) y el roble melojo (*Quercus pyrenaica*) (Rivas-Martínez, 1987). Los robledales ocupan la zona de montaña entre 1700 y 1400 m.s.n.m., extendiéndose por toda la sierra de Madrid.

La abundancia de corzos en el área de estudio es baja y está directamente relacionada con el medio forestal (Horcajada-Sánchez y Barja, 2015) con un sistema de aprovechamiento basado en la caza de machos casi exclusivamente.

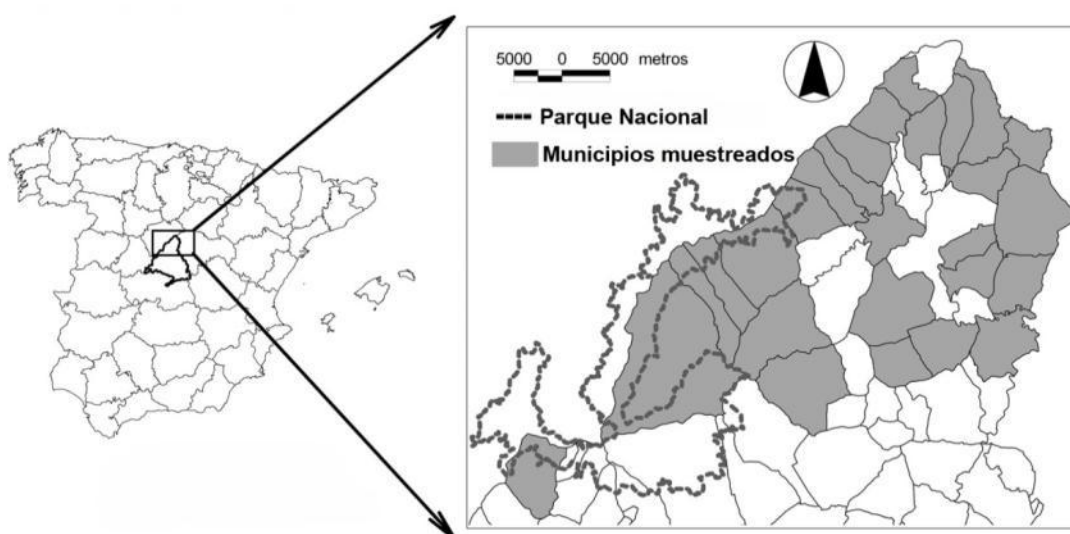


Figura 20. Localización del área de estudio en la Península Ibérica en el que se aprecian sombreados los municipios en los cuales se analizaron los ejemplares de corzo para su descripción morfológica.

Los bosque de pinos albar, aunque con un buen dosel arbóreo, tienen una baja diversidad y poca diversidad arbustiva debido principalmente a los trabajos de gestión forestal orientados a la lucha contra incendios (Bailón et al., 2008). Sin embargo, los matorrales y pastizales asociados a los bosques de roble, son de mayor interés trófico para los ramoneadores como el corzo (Maillard y Picard, 1987), con especies como zarzas (*Rubus* spp.), sauce negro (*Salix atrocinerea*), majuelo (*Crataegus monogina*), endrino (*Prunus spinosa*) y escaramujos (*Rosa* spp.).

2.2.2. Morfología y coloración

Los 154 ejemplares de corzo analizados, fueron cazados o atropellados (Fig. 20) en los 27 municipios del ámbito de estudio. Las descripciones de Danilkin y Hewison (1996) se utilizaron como referencia para medir las variables morfológicas (Fig. 21): (1) Longitud cabeza-cuerpo: desde el extremo del hocico hasta la base del cráneo más la totalidad de la columna vertebral. La base anatómica de esta longitud está formada por la parte dorsal del cráneo y la columna vertebral. (2) Altura a la cruz: desde el extremo de la pezuña de la pata anterior hasta la zona más alta del hombro, situando la pata perpendicularmente al eje del tronco. La base anatómica la constituye la extremidad anterior en toda su longitud. (3) Longitud del pie posterior: desde la pezuña hasta el punto medio de la curva del talón. La base anatómica se corresponde con el tarso, metatarso y dedos, excepto la pezuña. (4) Longitud del perímetro torácico: está medida se tomó ajustando la cinta métrica flexible al cuerpo del animal desde las axilas hasta la parte dorsal por ambos lados. La base anatómica está basada en el perímetro de la caja torácica. (5) Longitud de la oreja: desde la escotadura hasta el extremo del cartílago, sin incluir los pelos. La base anatómica está formada por el cartílago auricular del pabellón. (6) Longitud máxima de la cuerna: desde la base de la cuerna incluida la roseta hasta la punta más distante de la cuerna ajustando la cinta métrica a la forma de la cuerna. Todas las mediciones fueron realizadas por expertos usando una cinta métrica flexible a ($\pm 0,5$ cm). El peso corporal de cada animal se midió con un dinamómetro digital de WeiHeing (10-50 kg / ± 10 g) (Fig. 22).

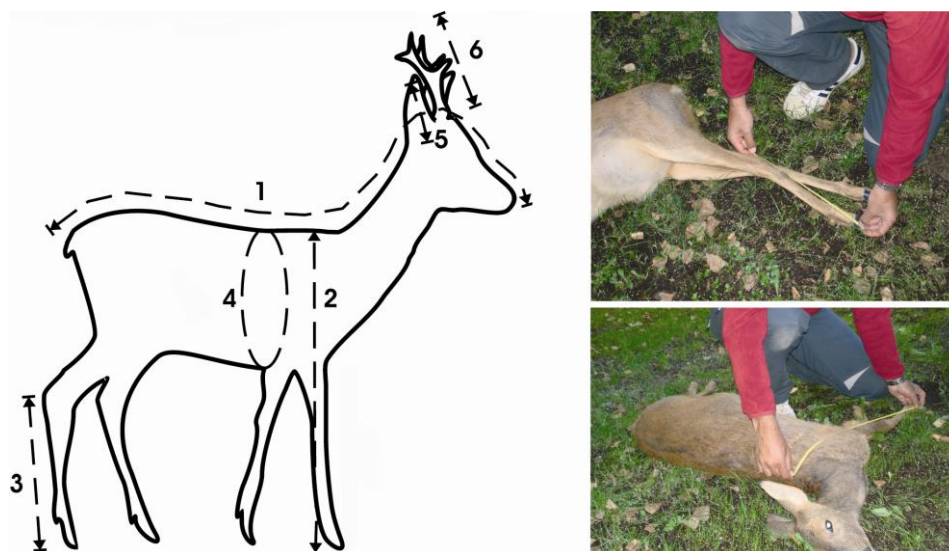


Figura 21. Medidas morfológicas analizadas y detalle de la toma de algunas de ellas.

Los ejemplares jóvenes menores de 1 año, identificados a través de las líneas de cemento dentario de los incisivos, se descartaron en la evaluación del dimorfismo sexual y en la descripción de las variables morfológicas de la población. Tan sólo se utilizaron para la descripción del crecimiento individual. Los animales mayores de 12 meses con un desarrollo físico ya muy avanzado (Loudon, 1987) y fértiles a partir de los 14 meses (Mateos-Quesada, 2011) fueron considerados como adultos.

Para la descripción de la coloración se ha considerado la variación estacional de la librea de los adultos y la presencia o ausencia de manchas blanquecinas, en la parte anterior del cuello, conocidas como babero. Ambos parámetros muestran una gran variabilidad según las poblaciones (Aragón, 1993). Las descripciones de los ecotipos de la Península ibérica (Lister et al., 1998; Miller, 1910; Cabrera, 1916; Meunier, 1983; Braza et al., 1996) se utilizaron como referencia para definir la tonalidad de la piel y las manchas del cuello, eligiendo las siguientes categorías para los ejemplares de la Sierra de Guadarrama: librea gris, marrón, rojiza y ocre; las manchas en forma de babero y babero con collar.

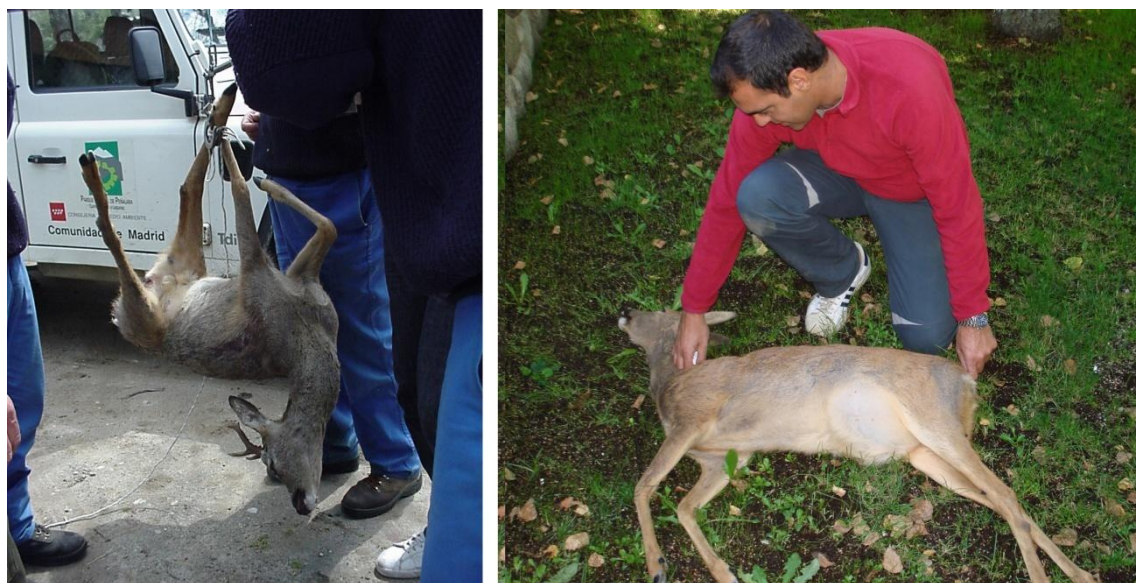


Figura 22. Midiendo y pesando un corzo macho cazado en la Sierra de Guadarrama y una corza hembra atropellada.

2.2.3. Determinación de la edad

La determinación de la edad de los ejemplares de corzo se realizó observando las líneas de cemento dentario. Este método fue utilizado previamente en otros trabajos de investigación con mamíferos. Como actualmente existen pocas referencias recientes del uso de esta técnica en la determinación de la edad del corzo (White, 1974; Aitken, 1975), el procedimiento utilizado fue una adaptación de trabajos previos descritos para otros mamíferos (Matson, 1981; Klevezal, 1996) o cérvidos (Azorit et al., 2002; Serrano, 2005). Así, la técnica utilizada en este estudio consistió en la extracción de los incisivos I de las mandíbulas, fijándolos y preservándolos en una solución de formol al 10%. Posteriormente los dientes se descalcificaron en un recipiente con tapa perforada en una solución al 4-6% de HNO_3 en agua destilada durante 6 h.

Posteriormente, la pieza dentaria descalcificada se sumergió en agua durante 24 h, neutralizándola posteriormente con una solución acuosa de Li_2CO_3 . A continuación se procedió a cortar las secciones (Fig. 23) en criostato a una temperatura de -22°C incluidas en gel de congelación (*freezing agent-Kamura*). Las secciones se realizaron a $20\ \mu\text{m}$ y se lavaron con agua destilada, tiñéndolas después con hematoxylina de Ehrlich durante 12h (Klevezal, 1996) (Fig. 23). Posteriormente se lavaron con agua

destilada durante 30 min. Finalmente, las secciones se montaron en un medio acuoso tipo aquatex y se sellaron de forma permanente con goma arábica para observar las líneas de crecimiento (Fig. 23).

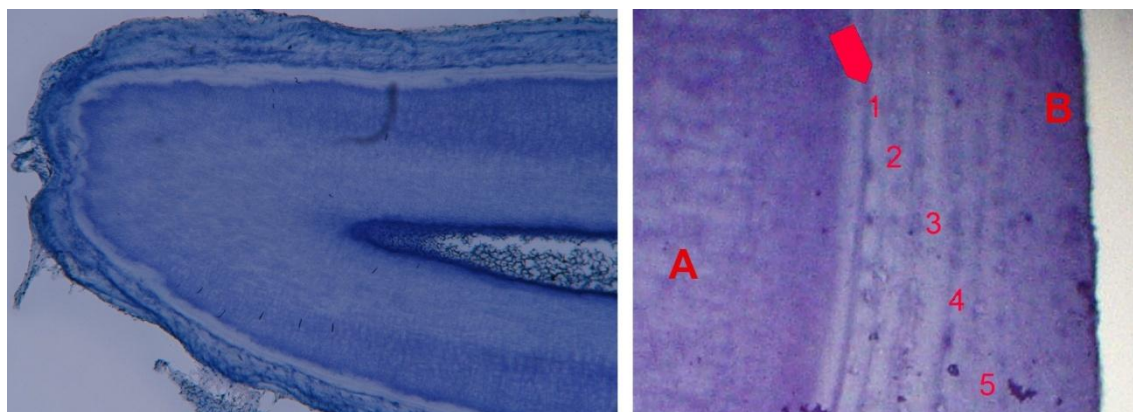


Figura 23. Corte y tinción de un incisivo. (A) Dentina, (B) cemento y (1-5) líneas de crecimiento. Tinción 15' Hematoxylina de Erlich (aumento 40 X).

En la determinación de la edad, además del número de líneas de crecimiento de los incisivos se utilizó la siguiente información: (1) en el área de estudio la mayoría de los partos tienen lugar en mayo (Horcajada, 2007), (2) la dentición definitiva se completa a los 13 meses (Aitken, 1975), (3) la primera línea de cemento se deposita en enero (Serrano, 2005), (4) normalmente y, salvo en situaciones de estrés (celo, partos o inanición), no se deposita más de una línea por año (Grue y Jensen, 1979; Azorit et al., 2004).

2.2.4. Análisis estadístico de los datos

El test de Shapiro-Wilk fue utilizado para determinar si las variables continuas se ajustaban a una distribución normal y el test de Levene para comprobar si había homogeneidad de varianzas para las variables biométricas. Para evaluar la relación entre las medidas corporales y la edad de los ejemplares se realizaron análisis de regresión simple. Un gráfico del modelo que representa en ordenadas los valores de la variable considerada y en abscisas el tiempo, da una curva de tipo sigmoideo (García-González, 1980), deduciéndose que los modelos que mejor se ajusten se asemejarán al

modelo logístico (Fandos, 1991), por lo que se eligieron 3 modelos, logístico, logarítmico y crecimiento.

En la determinación del grado de dimorfismo sexual de cada variable biométrica se realizó un análisis de ANOVA incluyendo como factor fijo el sexo. Cuando no se cumplía con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron test no paramétricos de Kruskal-Wallis. Para determinar la existencia de una relación entre el tamaño corporal y la coloración se realizó un análisis discriminante incluyendo como variables clasificadoras la longitud cabeza-cuerpo, la altura a la cruz, la longitud pie posterior y el contorno torácico, en los grupos de coloraciones (grisáceo estival, marrón, ocre y rojizo) de los corzos observadas durante la muda de verano.

Los datos de las variables biométricas son presentados como la media \pm desviación estándar (SD). El nivel de significación considerado para rechazar la hipótesis nula fue $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software SPSS 17.0.

2.3. Resultados

2.3.1. Crecimiento ponderal, corporal y dimorfismo sexual

De los 154 corzos analizados, sólo en 138 ejemplares se dispuso de datos sobre la edad (1-93 meses; $34,3 \pm 20,8$). El peso medio de los corzos macho adultos fue de $23,9 \pm 1,8$ kg ($n = 83$) y el de las hembras adultas $22,9 \pm 3,1$ kg ($n = 25$), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2 = 4,59$, g.l. = 1, $P = 0,03$, $n = 108$). Tanto en machos ($r = 0,89$, $p = 0,0001$, $n = 95$) como en hembras ($r = 0,98$, $p = 0,0001$, $n = 37$), se observó una relación positiva significativa entre el peso corporal y la edad de los ejemplares analizados (Fig. 24) (Tabla 2).

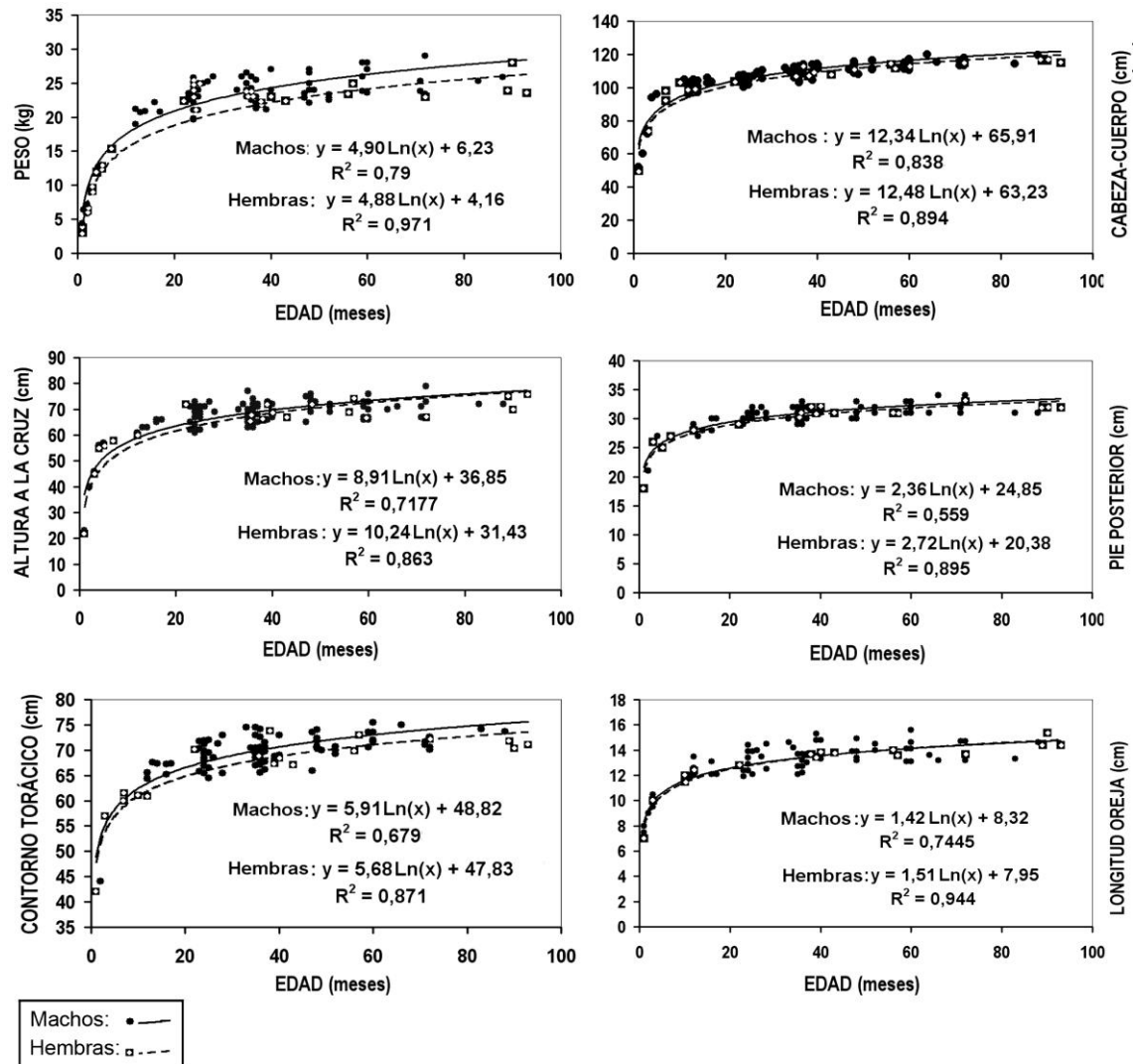


Figura 24. Funciones de crecimiento ponderal y corporal de machos y hembras de corzo en función de la edad con ajuste a las funciones logarítmicas.

Todas las medidas corporales estaban correlacionadas positivamente con la edad (Fig. 24) (Tabla 2). El perímetro torácico fue significativamente mayor en machos que en hembras (Tabla 3). Sin embargo, las diferencias entre machos y hembras para el resto de medidas corporales no resultaron significativas (Tabla 3). Tanto para las medidas corporales como para el peso, las funciones que mejor se ajustaron a los modelos de crecimiento fueron las logarítmicas (Fig. 24) (Tabla 2).

Tabla2. Resumen de dos de los modelos utilizados para describir el crecimiento individual del corzo de la Sierra de Guadarrama. En todos los casos el mejor ajuste fue obtenido con la función logarítmica.

Resumen de dos de los modelos utilizados para describir el crecimiento individual								
Medidas corporales	Sexo	Función	Resumen del modelo				Estimaciones de los parámetros	
			R ²	F	gl ₁	Sig.	Constante	Pendiente
Altura a la cruz	Macho	Logarítmica	0,718	269,516	1	0,000	36,854	8,916
		Logística	0,255	36,361	1	0,000	0,018	0,995
	Hembra	Logarítmica	0,859	97,480	1	0,000	32,232	9,856
		Logística	0,391	10,273	1	0,006	0,023	0,993
Long. cabeza-cuerpo	Macho	Logarítmica	0,839	619,470	1	0,000	65,916	12,342
		Logística	0,369	69,688	1	0,000	0,011	0,996
	Hembra	Logarítmica	0,894	126,964	1	0,000	63,233	12,484
		Logística	0,433	11,434	1	0,004	0,012	0,996
Perímetro torácico	Macho	Logarítmica	0,680	206,070	1	0,000	48,822	5,916
		Logística	0,281	37,819	1	0,000	0,016	0,998
	Hembra	Logarítmica	0,871	101,373	1	0,000	47,837	5,683
		Logística	0,470	13,281	1	0,002	0,017	0,997
Peso	Macho	Logarítmica	0,798	368,435	1	0,000	6,233	4,900
		Logística	0,288	37,585	1	0,000	0,066	0,990
	Hembra	Logarítmica	0,972	686,441	1	0,000	4,163	4,885
		Logística	0,543	23,761	1	0,000	0,129	0,984

2.3.2. Diferencias en la coloración del pelaje

En 132 corzos de los 154 ejemplares analizados morfológicamente, se obtuvieron datos sobre la descripción de la coloración del pelaje. La muda de invierno y verano estableció diferencias en los patrones de coloración de los corzos. Los ejemplares con muda de invierno (n= 15) mostraron todos una librea similar, con una coloración grisácea con tonalidades pardas aclaradas en la parte ventral, cuello e interior de las extremidades.

De todos los ejemplares sólo dos mostraron manchas blancas en la parte anterior del cuello en forma de doble babero y simple babero con collar. En el resto de ejemplares (n= 117) con muda de verano se observaron cuatro coloraciones diferentes

(Fig. 25): grisácea, similar a la librea invernal aunque con el pelo más corto y menos quebradizo (n= 24), marrón (n= 34), rojiza (n= 28) y ocre (n= 31).



Figura 25. Coloraciones observadas durante la muda de verano en los ejemplares de corzo de la Sierra de Guadarrama. (1) Grisácea, (2) marrón, (3) rojiza y (4) ocre.

En las coloraciones de verano las zonas más claras en la parte ventral, cuello e interior de las extremidades eran menos conspicuas. Las únicas zonas que mostraron una coloración diferente a las descritas en los ejemplares estudiados en ambas mudas han sido el espejo anal blanco, el interior de las orejas, los párpados y labios, de color blanco sucio y el bigote negro en el labio superior.

Los resultados del análisis discriminante descartaron la existencia de una relación entre las variables clasificadoras (longitud cabeza-cuerpo, altura a la cruz, longitud pie posterior y contorno torácico) y las diferentes coloraciones durante la muda de verano (grisácea, marrón, rojiza y ocre) (Fig. 26). Las pruebas de igualdad de las medias de cada medida corporal reflejan los niveles de significación (Tabla 4).

Tabla 3. Variación de las dimensiones corporales (media \pm SD) del corzo de la Sierra de Guadarrama en relación con el sexo. Para determinar el grado de dimorfismo sexual de cada variable se usó el test de ANOVA incluyendo el sexo como factor fijo. Cuando los datos no cumplieron los criterios de normalidad y homogeneidad de la varianza se utilizó el test de Kruskal-Wallis H.

Descripción de las dimensiones corporales y el dimorfismo sexual			
Medidas corporales	Sexo	Media \pm SD	Dimorfismo sexual estadísticos
Longitud cabeza-cuerpo	Macho	110,2 \pm 4,1 (n= 93)	$\chi(1)^2 = 0.2$, gl= 1, $P = 0.651$
	Hembra	108,8 \pm 6,3 (n= 27)	
Altura a la cruz	Macho	69,2 \pm 3,7 (n= 95)	$F = 1.87$, gl = 1, $P = 0.173$
	Hembra	68,1 \pm 3,6 (n= 29)	
Longitud pie posterior	Macho	31,1 \pm 1,1 (n= 95)	$\chi(1)^2 = 0.79$, gl = 1, $P = 0.778$
	Hembra	30,9 \pm 2,8 (n= 28)	
Perímetro torácico	Macho	70,2 \pm 2,5 (n= 89)	$F = 9.15$, gl = 1, $P = 0.003$
	Hembra	68,4 \pm 3,2 (n= 28)	
Longitud de la oreja	Macho	13,5 \pm 0,9 (n= 67,	$F = 0.18$, gl = 1, $P = 0.672$
	Hembra	13,6 \pm 1,4 (n= 20)	
Longitud máxima de la cuerna	Macho	19,4 \pm 3,1 (n= 86)	

Tabla 4. Pruebas de igualdad de las medias de los grupos en el análisis discriminante para evaluar la existencia de diferentes grupos en función de las variables seleccionadas.

Pruebas de igualdad del análisis discriminante				
Medidas corporales	Lamda de Wilks	F	gl	p
Longitud cabeza-cuerpo	0,960	1,319	3	0,273
Altura cruz	0,958	1,401	3	0,247
Longitud pie posterior	0,945	1,850	3	0,143
Perímetro torácico	0,978	1,727	3	0,538

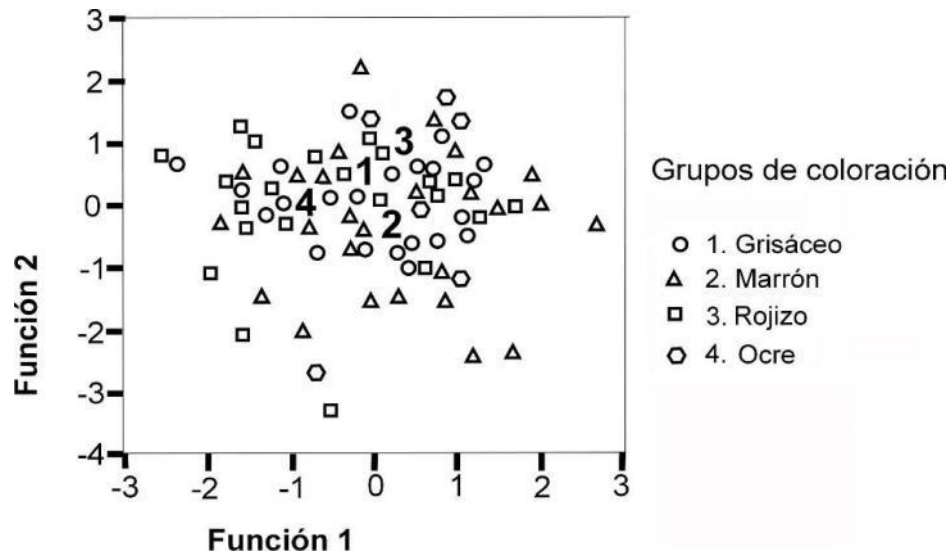


Figura 26. Diagrama de dispersión de los dos primeros ejes canónicos obtenidos del análisis discriminante para las 4 coloraciones encontradas.

2.4. Discusión

Los parámetros biométricos analizados en poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama, en general, mostraron una alta correlación con la edad, con un rápido crecimiento de los individuos similar en ambos sexos. Este patrón se ajusta a la descripción general de la especie para otras poblaciones europeas (Fruzinski et al., 1.982; Baviere, 1.983; Von Lehmann y Sägeser, 1.986) y ha aportado buenos modelos de crecimiento individual para el ámbito de estudio, aplicables en la gestión cinegética. El modelo que mejor se ajustó con los datos observados en campo fue el que utilizó la función logarítmica, en consonancia con otros estudios, tanto en el corzo (Braza et al., 1994) como en otros ungulados (Markina et al., 2004). El menor ajuste de modelos como el logístico, empleado con frecuencia en este tipo de descripciones (Dempster, 1975; Soriguer, 1980) podría estar relacionado con el tipo de muestra analizada, ejemplares en su mayoría adultos procedentes de los aprovechamientos de caza. Otros modelos usados habitualmente en la descripción del crecimiento en vertebrados como Gompertz y Von Bertalanffy, usados habitualmente en ungulados (Georgiadis, 1985), han sido descartados para el corzo, ya que se aplican para tasas de crecimiento más bajas y continuas hasta las últimas etapas, como la cabra montés (Fandos, 1991).

La técnica de determinación de la edad a través de las líneas de crecimiento dentario ha aportado buenos resultados, mostrando secciones dentarias con líneas de crecimiento bien definidas. Algunos estudios han detectado variaciones en cuanto a la época de crecimiento o reposo según el área geográfica, el ambiente o las diferentes poblaciones (Harris, 1978; Grue y Jensen, 1979). La marcada estacionalidad de la Sierra de Guadarrama (Rivas-Martínez, 1987), ha permitido que esta técnica mejore su eficacia debido a que la incidencia de las líneas de crecimiento dentario se ve favorecida por las diferencias estacionales (Stallibrass, 1982). En consonancia con estas observaciones, otros autores también han analizado relaciones entre patrones de crecimiento y clima, por ejemplo en cabra montés (*Capra pyrenaica*), donde se encontró una correlación entre la proporción de lluvia caída durante el año y el incremento de los medrones en los cuernos (Fandos, 1991).

Los ejemplares adultos analizados en el presente estudio presentaron un dimorfismo sexual escaso, con pocas diferencias entre machos y hembras, en consonancia con la descripción general de la especie (Fruzinski et al., 1982; Blant, 1987; Maillard et al 1989; Aragón, 1993; Braza et al., 1994). A diferencia de otros estudios realizados en poblaciones de la Península Ibérica, tanto en las poblaciones del sur (Aragón et al., 1993) como en las poblaciones del norte (Costa, 1995), en los que se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en el peso y altura a la cruz, los ejemplares analizados en la Sierra de Guadarrama mostraron diferencias significativas en el peso y el perímetro torácico, lo que define a los machos como más corpulentos, aunque no más altos que las hembras. La adquisición de una corpulencia mayor en los machos no parece ser fundamental para el corzo debido a su carácter prácticamente monógamo, al contrario de lo que ocurre en otros cérvidos como el ciervo (*Cervus elaphus*) y el gamo (*Dama dama*), especies polígamas con un dimorfismo sexual mucho más patente, que defienden el acceso a las hembras con enfrentamientos directos y cuyo alto grado de dimorfismo está relacionado con su estrategia polígama como regla general (Loison et al., 1999; Carranza, 1996). Aunque algunos autores, han descrito situaciones en las que se podía hablar de un sistema de apareamiento poligínico en el corzo (Strandgaard, 1972), otros han observado que la

rivalidad entre machos por acceder a las hembras parece responder a un protocolo de disuasión entre ellos para medir las fuerzas y evitar la lucha (saltos cabriolas, juegos de equilibrio y llamativos movimientos con la cabeza) (Goss, 1983).

Con respecto al peso, y a pesar de ser un parámetro con una fuerte dependencia de las condiciones ambientales, especialmente en los machos, llegando incluso a experimentar cambios en un solo día de entre 1 y 3 kg dependiendo de la cantidad de comida o agua consumidas (Holand, 1992), no fue posible obtener pesos de ejemplares eviscerados por lo que este sesgo se intentó suavizar con un elevado número de muestras (n= 108). Aunque los machos de la Sierra de Guadarrama pesaron más que las hembras, sus pesos medios fueron sensiblemente más bajos que los de las poblaciones del norte de España (Costa, 1995) y ligeramente más altos que las poblaciones del sur (Aragón, 1993). Por tanto, parece tratarse de un ecotipo de corpulencia mediana en el conjunto de la población de la Península Ibérica. Los parámetros morfológicos en la Península Ibérica muestran variaciones en peso y en tamaño que no se corresponden con un gradiente determinado (Braza et al., 1994; Fandos, 1994; Costa, 1995). Esta variabilidad, al igual que en el resto de su área de distribución parece responder a la influencia de los factores climáticos, las condiciones ecológicas y geográficas, la capacidad de carga del medio y la calidad del alimento (Delibes, 1996). Las poblaciones más meridionales pertenecientes a Cádiz y Málaga parecen poseer los ecotipos menos corpulentos del continente, siendo los menos pesados y con menor altura a la cruz de toda Europa (Aragón, 1993).

Si comparamos los rangos de variación morfológica obtenidos para el corzo en toda su área de distribución, las dimensiones obtenidas en los corzos estudiados en la Sierra de Guadarrama estuvieron dentro de los rangos asignados a la especie, aunque las medidas de las 6 variables analizadas (longitud cabeza-cuerpo, altura a la cruz, longitud del pie posterior, longitud del perímetro torácico, longitud de la oreja, longitud máxima de la cuerna) se situaron por debajo de la media definida para estas medidas corporales en el conjunto de población europea (Danilkin et al., 1996). Las condiciones ambientales (pinos de repoblación, carga ganadera) y especialmente la

disponibilidad de alimento han sido identificadas por algunos autores como factores directamente relacionados con el desarrollo corporal (Hannus y Fiser, 1981; Sägeser, 1996). En este aspecto, la baja diversidad arbustiva de las masas de pino albar de repoblación de la zona de estudio (Bailon et al., 2008) podrían estar limitando el tamaño de los ejemplares.

Por último, con respecto a la coloración del pelaje, ha sido un parámetro utilizado históricamente para determinar subespecies y formas locales (ecotipos) a lo largo de toda Europa (Pasternak, 1955; Lehmann, 1971) y la Península Ibérica (Meunier, 1983; Aragón, 1993; Lister et al., 1998). Durante el siglo XX en la Península Ibérica se identificaron tres subespecies en las que la coloración fue la base fundamental de sus descripciones: *C.c. decorus* Cabrera, 1916, del noroeste de la Península Ibérica, descrito como de tonos amarillentos, un punto brillante en la garganta y una media luna pecho, a modo de babero; *C.c. canus* Miller, 1910, del norte de España, grisáceo y con la cara y cuerpo con tonalidades parecidas y babero poco conspicuo y *C. c. garganta* Cabrera, 1916, en el sur de España, con dos patrones de coloración diferentes, que corresponden a los popularmente llamados corzos "collalbo" rojizo en verano y gris en invierno pudiendo presentar baberos en el cuello y "morisco" cuya coloración gris no varía a lo largo del año y presenta un babero en el cuello (Aragón, 1993).

Los ecotipos identificados en este estudio en la Sierra de Guadarrama llaman la atención por la gama de coloraciones que muestran (rojiza, marrón, ocre y gris), especialmente en la muda de verano, lo que le convierte en una población relativamente diversa comparada con las descripciones de las otras poblaciones antes citadas. De hecho, las diferentes variedades encontradas en la Sierra de Guadarrama podrían asemejarse a cada una de las subespecies descritas para la Península Ibérica durante el siglo XX, con ejemplares grises en invierno y verano como la variedad "morisco" y *C.C. canus* o rojizos en verano y grises en invierno como la variedad "collalbo" u ocre como la subespecie *C.c. decorus*. Resulta evidente que esta variedad de ecotipos dentro de una misma población invalida a la coloración como criterio

adecuado para definir grupos taxonómicos, como ya lo han afirmado otros autores, tanto para poblaciones europeas (Pasternak, 1955; Von Lehmann y Sägeser, 1986), como para las de la Península Ibérica (Fandos y Reig, 1993; Braza et al., 1994; Fandos, 1994).

Los gradientes latitudinales o el clima, factores reguladores de la coloración en otras poblaciones europeas (Pasternak, 1955; Lehmann, 1971), no se corresponden tampoco con lo observado en las poblaciones analizadas en la Sierra de Guadarrama. Al tratarse de una población situada en el extremo meridional del ámbito de distribución de la especie, se debería esperar una baja diversidad de ecotipos. Sin embargo, la alta diversidad observada podría estar relacionada más bien con las teorías que abogan por la existencia de refugios en el Pleistoceno de la Península Ibérica (Gliozzi et al., 1997; Hufthammer y Aaris-Sørensen, 1998; Taberlet et al., 1998), siguiendo posteriormente rutas de recolonización hacia el norte de Europa (Hewitt, 1999) o manteniéndose como una zona geográfica aislada (Lorenzini y Lovari, 2006), lo que habría aportado a las poblaciones de Guadarrama una variedad de ecotipos con aspecto externo diferente.

CAPÍTULO 3

Horcajada-Sánchez, F.; Alcaraz, L.; Barja, I. & Machardom, A. (under review). Phylogeographic patterns of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Sierra de Guadarrama, centre of Iberian Peninsula, and its framing in a European context. *Journal of Mammalogy*.

3. FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CORZO EN LA SIERRA DE GUADARRAMA: COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES ESPAÑOLAS Y EUROPEAS

Resumen

Existe poca información publicada sobre la variabilidad y el marco filogenético del corzo (*Capreolus capreolus*) en la Península Ibérica, aunque cada vez hay más evidencias sobre la importancia que las penínsulas del sur de Europa tuvieron como refugios genéticos durante el Pleistoceno. Sobre la base de este marco, nuestro objetivo es contribuir a un análisis molecular completo de las poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama, con el fin de aumentar el conocimiento de la filogenia de esta especie en España y su encuadre en el contexto europeo. Para ello se pudo contar con 101 muestras de tejido muscular de ejemplares del centro de la Península Ibérica (Sierra de Guadarrama). Las secuencias de la región de control (D-loop) del ADN mitocondrial de estas muestras se compararon con las obtenidas en otros estudios previos, evaluando su variabilidad y situándolas en el contexto de su distribución europea. Como información complementaria se recurrió al uso de marcadores microsatélites (ADN nuclear), profundizando así en la comprensión de la estructura poblacional y parámetros genéticos como el polimorfismo, la riqueza alélica, la heterocigosis y la endogamia. La combinación de ambas metodologías mostró parte de la compleja historia de los corzos en la Península Ibérica y en especial en la Sierra de Guadarrama. Por una lado, una estructura filopátrida, con hembras manteniendo una riqueza de elevada de haplotipos mitocondriales de diversos orígenes, mientras que por otro, una homogeneización del genoma, con una sola población, fiel reflejo de la historia reciente de la especie en el Centro Peninsular. Por lo tanto, distintos momentos de la paleohistoria de la especie han podido ser explicados a través de estos análisis genéticos: las etapas glaciales e interglaciares del Pleistoceno que aportaron diversidad genética con ejemplares de diferentes poblaciones y la historia de los últimos siglos, con la reducción y aislamiento de las poblaciones del centro peninsular. Los dos marcadores utilizados, teniendo distinta herencia y una tasa de

mutación desigual, reflejarían cada uno de ellos, las dos principales etapas en la evolución reciente de los corzos de la Sierra de Guadarrama.

3.1. Introducción

Cada vez existen más evidencias sobre la importancia que las penínsulas del sur de Europa tuvieron como refugios de diversidad genética durante el Pleistoceno (Gliozzi et al., 1997; Hufthammer y Aaris-Sørensen, 1998; Randi et al., 2004). Taberlet et al. (1998) a partir de un estudio filogeográfico en el que incluyeron 10 taxones genéticamente muy diferentes (mamíferos, anfibios y artrópodos) concluyeron que la Península Ibérica, Italia y los Balcanes habrían actuado como un importante reservorio de biodiversidad durante la última glaciación.

El corzo (*Capreolus capreolus*) también formó parte de la fauna cobijada en estos refugios, estando presente en la Península Ibérica y los Balcanes, así como en el sur de Italia durante la última era glacial (Gliozzi et al., 1997; Hufthammer y Aaris-Sørensen, 1998; Randi et al., 2004). Sin embargo, las dudas surgen a la hora de valorar la importancia que estos refugios mediterráneos tuvieron en la recolonización de las regiones del Norte de Europa. Existen estudios como el de Hewitt (1999) que indica que los corzos siguieron diferentes rutas de dispersión y recolonización hacia el norte de Europa después de la época glacial. Sin embargo, otras investigaciones apuntan a que, aunque las regiones del sur funcionaron como un eficaz refugio, las poblaciones de corzo, en lugar de expandirse hacia el norte, se mantuvieron como una zona geográfica aislada, no actuando como una fuente para recolonizaciones postglaciales, debido en parte a que los grandes sistemas montañosos limitaron los movimientos de las poblaciones (Lorenzini y Lovari, 2006; Sommer et al., 2009). Las rutas de recolonización del norte de Europa partieron probablemente del área de distribución de uno o más refugios en Europa Central y Oriental, en lugar de proceder de las zonas mediterráneas (Sommer et al., 2009).

La presencia del corzo en la Sierra de Guadarrama en el Pleistoceno Medio fue bastante significativa, tal y como atestiguan los restos del yacimiento de Pinilla del

Valle (Buitrago, 1992). Estas sierras, además de funcionar como refugio en épocas pleistocénicas, han salvaguardado poblaciones de corzo y de otras muchas especies de vertebrados frente al acoso del hombre, que las ha eliminado de hábitats más llanos y accesibles en épocas más recientes (Tellería, 1999), lo que pone en valor aún más las poblaciones de corzo de esta zona montañosa del centro peninsular.

Recientes avances en el campo de la genética de poblaciones y nuevos hallazgos paleontológicos, han impulsado el desarrollo de la filogeografía que ha dado lugar a una nueva visión de la distribución y filogenia para varias especies de ungulados europeos, incluidas algunas especies considerablemente manipuladas por el hombre, como es el caso del corzo (Randi et al., 2004; Baker y Hoelzel, 2014).

La gran plasticidad morfológica del corzo ha motivado discordancias en lo que respecta a su estatus taxonómico, no estando su origen todavía claro. Desde un punto de vista paleontológico, los parientes más antiguos de los corzos modernos aparecieron en toda Europa muy temprano, al inicio del Pleistoceno Medio (hace 900-800.000 años), mientras que las formas estrechamente relacionadas con la especie existente pueden haber estado presentes en el sur de Europa ya cerca del final del Pleistoceno Medio, hace aproximadamente 250.000 años (Lister et al., 1998).

En cuanto a estudios genéticos, para las poblaciones de la Sierra de Guadarrama, apenas existen datos publicados sobre su variabilidad, su origen o su encuadre filogenético dentro del conjunto de las poblaciones españolas y europeas. Además, las fuertes reducciones sufridas en las poblaciones del Sistema Central en el siglo XIX y primera mitad del siglo XX (Tellería y Virgós, 1997; Gortázar et al., 2000) pueden haber dejado huella en los parámetros genéticos de esta población. La deforestación y la caza excesiva llevaron a la disminución y erradicación de las poblaciones de corzo, sobre todo en el centro y sur de la Península Ibérica (Aragón et al., 1995). Entre los escasos análisis genéticos que existen sobre las poblaciones ibéricas, tan sólo el de Randi et al. (2004) y más recientemente el realizado por Royo et al. (2007), incluyen ciertas localidades procedentes de este área. En este último estudio se incluyeron 14

muestras recolectadas en Montes de Toledo y la Sierra de Guadarrama, con el fin de caracterizar su estructura genética y completar el conocimiento de las relaciones de estas poblaciones entre sí y con el resto de los núcleos europeos. Si bien se pretendió dar un resultado general, dada la existencia de formas genéticas diferenciadas y su coexistencia en varias regiones, eran necesarias investigaciones más detalladas, como los propios autores indicaban, para abordar correctamente el manejo de esta especie en nuestro territorio.

3.2. Material y métodos

3.2.1. *Ámbito de estudio*

El trabajo de campo de este estudio se llevó a cabo entre los años 2002 y 2007 en 22 localidades de la Sierra de Guadarrama, en el centro de la Península Ibérica (Fig. 27, Tabla 5). Actualmente 4 de ellas están dentro del territorio del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Las muestras fueron recopiladas en montes públicos de pinar silvestre (*Pinus sylvestris*) y robledal (*Quercus pyrenaica*).

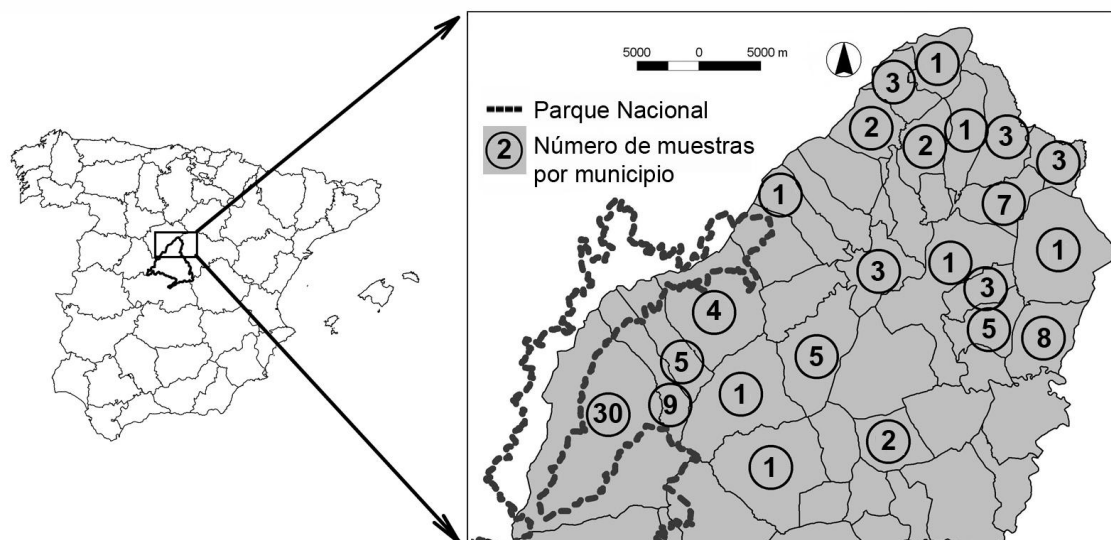


Figura 27. Localización del área de estudio en la Península Ibérica en el que se aprecian el número de muestras de músculo recogidas en cada uno de los municipios de la Sierra de Guadarrama.

El paisaje de montaña de la zona de estudio se compone de bosques, matorrales y pastizales. Los bosques de pino albar (*Pinus sylvestris*) se encuentran entre los 1.200 y

1.900 m. de altitud y muestran un sotobosque con especies como el piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*), el enebro común (*Juniperus communis*) o el cambroño (*Adenocarpus hispanicus*), alternándose con algunas otras especies como el acebo (*Ilex aquifolium*) y el roble melojo (*Quercus pyrenaica*) (Rivas-Martínez, 1987). Los robledales ocupan la zona de montaña entre 1700 y 1400 m.s.n.m., extendiéndose por toda la Sierra de Guadarrama.

La abundancia de corzos en el área de estudio es baja y está directamente relacionada con el medio forestal (Sáez-Royuela y Tellería, 1991; Horcajada-Sánchez y Barja 2015) con un sistema de aprovechamiento basado en la caza de machos casi exclusivamente. Los bosque de pinos albar, aunque con un buen dosel arbóreo, tienen una baja diversidad arbustiva debido principalmente a los trabajos de gestión forestal orientados a la lucha contra incendios (Bailón et al., 2008). Sin embargo, los bosques de roble melojo, poseen un estrato arbustivo muy variado y abundante con especies como zarzas (*Rubus* spp.), sauce negro (*Salix atrocinerea*), majuelo (*Crataegus monogina*), endrino (*Prunus spinosa*) y escaramujos (*Rosa* spp.).

3.2.2. Conservación de las muestras y extracción del ADN

Las 101 muestras recolectadas procedían de individuos cazados o atropellados en accidentes de tráfico, a los que se les practicaba una pequeña biopsia muscular. Las muestras fueron mantenidas en etanol absoluto, a -20°C, hasta su análisis en el laboratorio.

Tras la eliminación del etanol y una vez troceada finamente una porción de cada muestra, se procedió a la extracción del ADN según el método clásico de fenol/cloroformo (Sambrook et al., 1989). Primero se procedió a la homogeneización en tampón CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) e incubación con proteinasa K durante 24 a 48 h. Luego se purificó el ADN con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol y acetato de sodio. Finalmente, el ADN ya purificado se re-suspendió en agua bidestilada estéril y se mantuvo a 4°C durante los procesos diarios, para posteriormente conservarlo a -20°C. En geles de agarosa se comprobó la presencia,

concentración y posible degradación del ADN extraído de las muestras. Este proceso de extracción es común para todos los tratamientos del ADN. En nuestro caso, estos tratamientos consistieron en la amplificación de una parte del ADN mitocondrial y el análisis de la variación de microsatélites.

3.2.3. Amplificación y análisis del ADN mitocondrial

La amplificación del ADN obtenido para la región de interés, se realizó mediante la técnica denominada PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para analizar el ADN mitocondrial se seleccionaron cebadores que se unen a fragmentos externos a la región control (D-loop) (en los ARN transferentes, regiones muy conservadas), de forma que pudiera obtenerse la secuencia completa de la misma. La región elegida, *D-loop* o región control del ADN mitocondrial (Fig. 28), fue seleccionada por su adecuado tamaño (algo más de 900 pares de bases) y variabilidad relativamente elevada para poder emprender análisis poblacionales. La región *D-Loop* es la más variable del genoma mitocondrial y puede aportar datos precisos sobre la variabilidad de la población, facilitando la comparación con otras poblaciones europeas o españolas (Douzery y Randi, 1997; Vernesi et al., 2002; Randi et al., 2004).

Las PCRs se llevaron a cabo con 1-3 µl ADN, 5 µl del tampón correspondiente (con 10x 2 mM MgCl₂), 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 0,8 µl de cebadores directo e inverso (10 µM), 0,3 µl Taq ADN polimerasa (5 U µl) (*Biotoools*) y agua doblemente destilada (ddH₂O) para un volumen total de 50 µl. Los ciclos de PCR fueron: 94 °C (4 min), 40 ciclos de 94 °C (45 s), 56 °C (1 min), 72 °C (1 min) y una extensión final a 72 °C (10 min).

Los cebadores usados fueron **L-Pro** (5'-CGT CAG TCT CAC CAT CAA CCC CCA AAG C-3') y **H-Phe** (5'-GGG AGA CTC ATC TAG GCA TTT TCA GTG-3') (Jäger et al., 1992). Dada la dificultad de amplificar ciertas muestras se recurrió a amplificaciones parciales, secuenciándolas en cuatro fragmentos solapantes para intentar eludir las regiones repetidas que hacían que la señal de la secuencia se perdiera o, como pudimos comprobar posteriormente, conseguir la secuencia de especímenes heteroplásmicos

(aquellos en los que se encuentra más de un tipo de ADN mitocondrial). Los cebadores internos usados fueron: **L-362** (5'-AAT CAC CAT GCC GCG TGA AAC C-3') y **H-493** (5'-TGA GAT GGC CCT GAA GAA AGA ACC-3') (Randi et al., 1998).

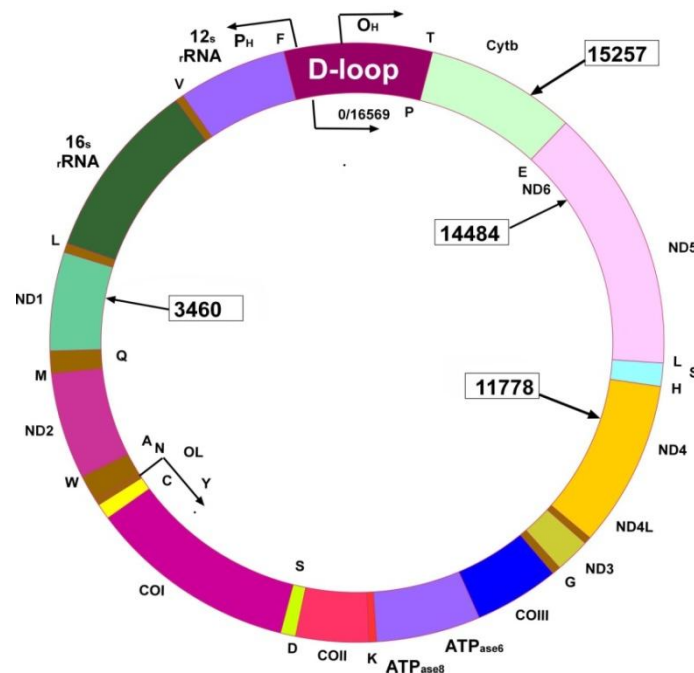


Figura 28. Esquema del ADN mitocondrial en vertebrados, en el que se aprecia la región control *D-loop* amplificada.

También se comprobó la amplificación positiva y su concentración sobre geles de agarosa (Fig. 29A), en los que se incluyó un marcador de talla (fragmentos de ADN de tamaño conocido) (Fig. 29B) para comprobar que el fragmento amplificado correspondía, al menos en tamaño, al que se esperaba obtener. Una vez amplificada adecuadamente cada muestra, el resultado fue purificado, para eliminar productos sobrantes, realizándose una última PCR, con nucleótidos marcados, para su secuenciación automática en el servicio de SECUGEN (Madrid).

Finalmente, los cromatogramas (representación gráfica de las secuencias) resultantes de cada reacción fueron combinados, comprobadas y corregidas las incongruencias entre las lecturas de cada hebra y la región de los distintos cebadores utilizados eliminada usando el programa Sequencher (Gene Codes Corporation). Una

vez obtenida la secuencia consenso resultante, cada una de ellas fue incluida en la matriz en formato Nexus, para los tratamientos posteriores.

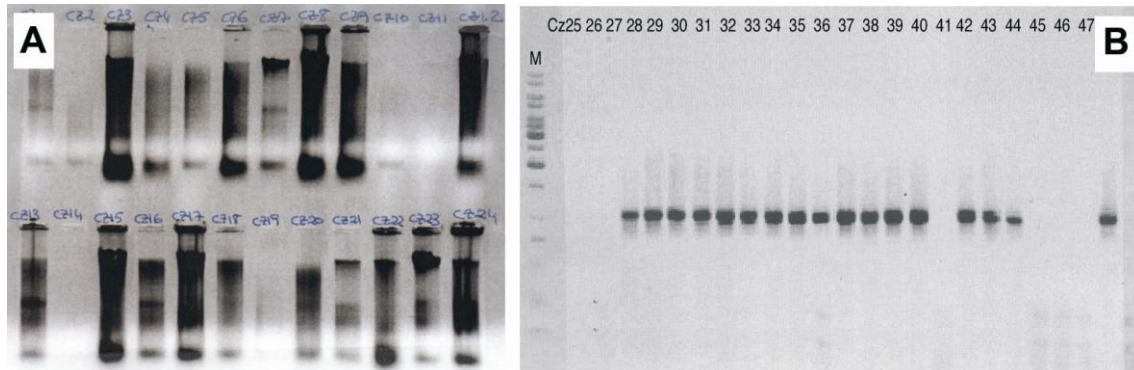


Figura 29. (A) Detalle de los geles de agarosa de la PCR para la región control (=D-loop) del ADN mitocondrial de las muestras analizadas de corzo de la Sierra de Guadarrama. (B) Detalle del marcador de talla (fragmentos de ADN de tamaño conocido) en la columna primera (M en el encabezado) para comprobar que el fragmento amplificado correspondía, al menos a 1000 pares de bases.

Para comparar las secuencias obtenidas en las muestras procedentes de la Sierra de Guadarrama con las de distintas poblaciones europeas de corzos, se recurrió a GenBank (banco de datos de acceso libre), donde se encuentran todas las secuencias génicas organizadas por distintos niveles (orden numérico, taxonómico, etc.). En dicho banco se encontró una secuencia completa de la región *D-loop* para el corzo (*C. capreolus*), procedente de Asiago, en los Alpes italianos, y otras 68 secuencias parciales procedentes de distintas zonas de Europa. Como grupo externo, para enraizar el árbol filogenético, se tomaron las secuencias completas del corzo asiático o pigargo (*Capreolus pygargus*) y parciales de una de sus subespecies (*Capreolus pygargus ochracea*). Para las poblaciones de la Península Ibérica se consultó Royo et al. (2007), donde se mostraba información genética de 100 ejemplares de diferentes zonas de España.

3.2.4. Amplificación y análisis de los marcadores microsatélites

Se seleccionaron 12 parejas de cebadores para el análisis de igual número de microsatélites, denominados BM1706, BM757, BM848, CSSM39, HUI1177, NVHRT48, BMC1009, CSSM41, CSSM43, IDVGA29, IDVGA8 y OarFCB304. Estos 12 microsatélites han sido empleados con anterioridad en otros estudios (Galán et al., 2003; Coulon et

al., 2004) en los cuales se ha comprobado que no están sometidos a desequilibrios de ligamiento. Para la amplificación de los marcadores microsatélites se establecieron las siguientes condiciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa): 95°C(10 minutos), 40 ciclos de 95°C (1 minuto), 52 a 54,8°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto), seguidos por una elongación final (7 minutos). Un cebador de cada pareja fue marcado con fluorocromos (6-FAM, HEX o NED). Los resultados y los tamaños de cada alelo se obtuvieron en un secuenciador ABI 3730.

A través de los marcadores microsatélites se realizó un análisis estándar de variabilidad genética, comparando la deficiencia de hererozigosis, tanto a nivel de cada locus como de forma global. Para cuantificar el posible desvío según lo esperado si las poblaciones estuvieran en equilibrio Hardy-Weinberg se calculó la F_{IS} (Weir y Cockerham, 1984) para cada locus y también en general. Así, la variabilidad genética se analizó computando la heterozigosis esperada (H_e), la observada (H_o) y la deficiencia de heterocigotos dentro de la población (F_{IS}).

De forma complementaria, se calcularon el coeficiente de coancestría y el PIC, del inglés "*Polymorphism Information Content*", para cada alelo. El coeficiente de coancestría se calculó, tanto entre individuos, indicando el grado de similitud de los individuos de una población (Caballero y Toro, 2002) como a través del coeficiente molecular de coancestría medio. Por su parte, el parámetro PIC, aportó información del valor que posee cada marcador en la detección de polimorfismo dentro de la población. A mayor PIC, mayor información proporciona el marcador en cuestión.

Por último, se definió la estructura genética de la población a través de dos métodos basados en modelos Bayesianos que permitieron inferir unidades genéticas utilizando sólo los genotipos de los individuos. La base de estos fue analizar la probabilidad de que existan distintos grupos de individuos que estén en el "equilibrio de Hardy-Weinberg". Además, esta información se pudo combinar con información geográfica (Guillot *et al.*, 2005).

3.2.5. Análisis de los datos

Para el análisis de datos procedentes del ADN mitocondrial se han utilizado dos paquetes estadísticos: TCS (*Phylogenetic network estimation using statistical parsimony*) (Clement et al., 2000) para el análisis de clados encajados, que relacionan los individuos o haplotipos por su similitud y designan grupos, que pueden ser englobados en otros, estructurando de esta forma la variabilidad encontrada y PAUP (*Phylogenetic analysis using parsimony*) (Swofford, 2003) para el estudio de relaciones filogenéticas o agrupaciones basadas en la relación ancestro-derivado.

En el análisis estándar de variabilidad genética mediante microsatélites se usaron los programas Genepop 3.4 (Raymond y Rousset, 1995) y Arlequin 3.0 (Schneider *et al.*, 2000) para realizar gran parte de los análisis estándar de genética de poblaciones. Para calcular el coeficiente molecular de coancestría y el PIC se usó el programa Molkin 2.0 (Gutiérrez *et al.*, 2005). Para analizar la estructura genética de la población a través de métodos basados en modelos Bayesianos se utilizaron los programas Structure 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000) y Geneland 0.3 (Guillot *et al.*, 2005).

El programa Structure determinó la cantidad más probable de poblaciones mediante aleatorizaciones de Montecarlo. Para este estudio, se analizó la probabilidad de que los datos correspondieran de 1 a 15 poblaciones, iterando cada análisis 1000 veces.

Con el programa Geneland, el número de poblaciones testadas varió igualmente entre 1 y 15, estableciéndose los siguientes parámetros: 500.000 simulaciones de Montecarlo, una tasa máxima de procesos de Poisson de 500, y un número máximo de núcleos en el modelo de 180. El modelo usado fue el de Dirichlet, modelo recomendado para calcular las frecuencias alélicas según Guillot *et al.* (2005). Por último, se calculó la probabilidad de pertenencia de cada píxel y cada individuo a una población determinada, con unos valores establecidos de 500 píxeles para el eje X y 500 para el Y, con la eliminación ("*burn-in*") de las primeras 500 iteraciones.

3.3. Resultados

3.3.1. Análisis del ADN mitocondrial

Se secuenció la región *D-loop* completa (928-930 pares de bases) para las 101 muestras estudiadas (GenBank números de acceso XXXXX a YYYYYY). Sólo un máximo de cinco “gaps” fueron necesarios para alinear el conjunto completo de datos, lo que supuso una longitud de matriz de 933 posiciones. En la matriz que contiene exclusivamente estas muestras, se encontraron 13 caracteres informativos en parsimonia. Posteriormente, se incorporaron las secuencias del GenBank, incluyendo los diferentes haplotipos encontrados en otros estudios, la mayoría de ellos a partir de *D-loop* parcialmente secuenciado, con longitudes de 340 a 342, 427, 678 de la secuencia completa, llegando a una matriz de 201 muestras y 936 caracteres. En esta última matriz, el número de caracteres informativos en parsimonia aumentó a 62.

Tras examinar 101 muestras de corzo procedentes de la Sierra de Guadarrama (Madrid) se han detectado 5 haplotipos diferentes, que se han designado con las 5 primeras letras del abecedario (Tabla 5), como se indicará en las distintas figuras.

Tabla 5. Datos sobre las muestras de tejido procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama analizadas durante este estudio. UTM_X e Y son las coordenadas UTM de la localización de cada uno de los individuos (Datum European, 1950).

Muestras de tejido procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama					
Referencia	Municipio	UTM_X	UTM_Y	Altitud (m)	Haplotipos
CZ-1	Rascafría	425039	4531724	1480	A
CZ-3	Rascafría	428031	4525279	1480	A
CZ-4	Rascafría	427093	4525949	1200	C
CZ-5	Rascafría	427692	4526370	1180	C
CZ-6	Canencia de la Sierra	434624	4526800	1280	C
CZ-7	Alameda del Valle	426457	4533062	1380	A
CZ-8	El Atazar	461934	4533845	1200	A
CZ-9	Rascafría	425489	4531429	1380	B
CZ-10	Rascafría	424402	4523207	1340	C
CZ-11	El Atazar	460382	4534403	1260	C
CZ-12	Robledillo de la Jara	456645	4534057	1120	C
CZ-13	Rascafría	424084	4527945	1260	B
CZ-14	Alameda del Valle	430534	4527825	1250	A

Muestras de tejido procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama					
Referencia	Municipio	UTM_X	UTM_Y	Altitud (m)	Haplotipos
CZ-15	Rascafría	423509	4525049	1260	A
CZ-16	Pinilla del Valle	429606	4534192	1480	A
CZ-18	Rascafría	427928	4527746	1150	A
CZ-19	Rascafría	427349	4523617	1280	A
CZ-20	Alameda del Valle	430451	4526797	1340	A
CZ-21	Alameda del Valle	427728	4532560	1300	A
CZ-22	Prádena	456906	4543816	1200	C
CZ-23	Rascafría	424736	4529303	1340	B
CZ-24	Rascafría	426793	4524643	1220	C
CZ-25	Bustarviejo	438922	4522947	1300	A
CZ-26	Serrada	455260	4538919	1080	C
CZ-27	Horcajo de la Sierra	450920	4547938	1120	C
CZ-28	Villavieja de Lozoya	439499	4543195	1340	B
CZ-29	Horcajuelo de la Sierra	454679	4550514	1420	D
CZ-30	Lozoya	434126	4536861	1520	C
CZ-31	La Cabrera	448312	4524652	1056	C
CZ-32	Buitrago de Lozoya	448358	4538640	990	C
CZ-33	Prádena del Rincón	456906	4543816	1200	C
CZ-34	La Acebeda	446791	4551006	1480	A
CZ-35	La Cabrera	448312	4524652	1056	A
CZ-36	Lozoya	434495	4535618	1260	C
CZ-37	Lozoya	430449	4535324	1720	C
CZ-38	Robregordo	448891	4553463	1520	A
CZ-39	Rascafría	422569	4530475	1760	A
CZ-40	Rascafría	419938	4517733	1820	C
CZ-41	Lozoya	431524	4535575	1440	--
CZ-42	Buitrago del Lozoya	445734	4534675	1110	C
CZ-43	Montejo de la Sierra	460300	4546947	1500	C
CZ-44	Robledillo de la Jara	457365	4532701	1100	C
CZ-45	Alameda del Valle	431027	4527351	1360	E
CZ-46	Rascafría	419527	4518678	1820	C
CZ-47	Rascafría	426162	4531425	1300	E
CZ-48	Alameda del Valle	428409	4532094	1200	A
CZ-49	Pinilla del Valle	429016	4533923	1540	--
CZ-50	Rascafría	425056	4530861	1440	A
CZ-51	Rascafría	426316	4525465	1193	C
CZ-52	Rascafría	426768	4525366	1240	A
CZ-53	Rascafría	425082	4526399	1180	--

Muestras de tejido procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama					
Referencia	Municipio	UTM_X	UTM_Y	Altitud (m)	Haplotipos
CZ-54	Rascafría	423978	4530578	1720	A
CZ-55	Rascafría	428877	4528897	1133	A
CZ-56	Rascafría	427196	4530674	1173	C
CZ-57	Rascafría	421769	4520012	1500	A
CZ-58	Rascafría	425755	4523950	1240	A
CZ-59	Garganta de los Montes	444878	4533541	1115	A
CZ-60	Rascafría	425568	4524579	1220	E
CZ-61	Rascafría	425553	4523390	1240	E
CZ-62	Alameda del Valle	427445	4533430	1520	A
CZ-63	Pinilla del Valle	428632	4533369	1460	A
CZ-64	Alameda del Valle	429579	4528435	1140	A
CZ-65	Rascafría	426390	4524322	1280	B
CZ-66	Rascafría	428735	4523720	1640	A
CZ-67	Prádena del Rincón	457934	4542301	1400	B
CZ-68	Prádena del Rincón	458734	4544374	1320	C
CZ-69	Canencia de la Sierra	438444	4530411	1140	A
CZ-70	Berzosa del Lozoya	455206	4536701	1020	C
CZ-71	Garganta de los Montes	442116	4528665	1300	A
CZ-72	El Atazar	459315	4531865	960	C
CZ-73	Robledillo de la Jara	455897	4532629	960	C
CZ-74	Horcajo de la Sierra	452007	4549173	1200	C
CZ-75	Robregordo	450334	4551973	1360	A
CZ-77	La Acebeda	446614	4548552	1340	B
CZ-78	Robregordo	449048	4552364	1500	A
CZ-79	Somosierra	452861	4554757	1700	C
CZ-80	Garganta de los Montes	444018	4532570	1220	B
CZ-81	Berzosa del Lozoya	454199	4535491	940	C
CZ-82	Prádena del Rincón	456795	4542630	1200	A
CZ-83	Robledillo de la Jara	458134	4534963	1040	C
CZ-84	Montejo de la Sierra	457606	4551188	1540	C
CZ-85	La Hiruela	462717	4545307	1540	C
CZ-86	El Atazar	460040	4533098	1140	C
CZ-87	Pinilla del Valle	429307	4534763	1580	A
CZ-88	Pinilla del Valle	433026	4529691	1340	C
CZ-89	Garganta de los Montes	442234	4532124	1130	A
CZ-90	Canencia de la Sierra	437569	4527216	1540	C
CZ-91	El Atazar	460081	4530421	920	C
CZ-92	El Atazar	461662	4532043	1180	C

Muestras de tejido procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama					
Referencia	Municipio	UTM_X	UTM_Y	Altitud (m)	Haplotipos
CZ-93	Montejo de la Sierra	458296	4548389	1280	A
CZ-94	Robledillo de la Jara	454726	4532895	990	C
CZ-95	La Hiruela	461744	4546158	1480	A
CZ-96	Puebla de la Sierra	462433	4539060	1280	E
CZ-97	Buitrago del Lozoya	447953	4537113	1000	C
CZ-98	Berzosa del Lozoya	457120	4536748	1340	C
CZ-99	La Hiruela	462960	4547010	1380	C
CZ-100	Prádena del Rincón	458661	4543035	1480	C
CZ-101	Garganta de los Montes	440327	4530948	1200	--

La frecuencia de las bases fue: A (adeninas)= 30%, C (citosinas)= 22,2%, G (guaninas)= 15,2% y T (timinas)= 32,5%, con un déficit de guaninas o un exceso de A+T típico de la región control. Los 5 haplotipos distintos, variaron desde sólo 3 hasta 14 bases, siendo estas sustituciones siempre transiciones (cambio entre bases púricas –A y G- o pirimidínicas –C y T). Para el alineamiento fue necesaria la inclusión de 4 “gaps” (inserciones o deleciones de bases), resultando una matriz de 935 caracteres (nucleótidos), con 18 posiciones variables en total.

Se detectaron dos ejemplares de características “especiales” (Cz45 y Cz47), en cuyas secuencias los cromatogramas mostraron picos dobles debido a la existencia de dos bases en un mismo punto, con dos genotipos en el mismo individuo, mostrando un fenómeno de heteroplasma. En este caso, los dobles picos se han encontrado justamente en las posiciones que diferencian los dos haplotipos mayoritarios, lo que indicaría un cruzamiento entre dos parentales con haplotipos distintos, como se observa en el cromatograma (Fig. 30). La presencia de este fenómeno se puede deber a mutaciones puntuales en un individuo o a que, extraordinariamente, el genoma paterno esté representado.

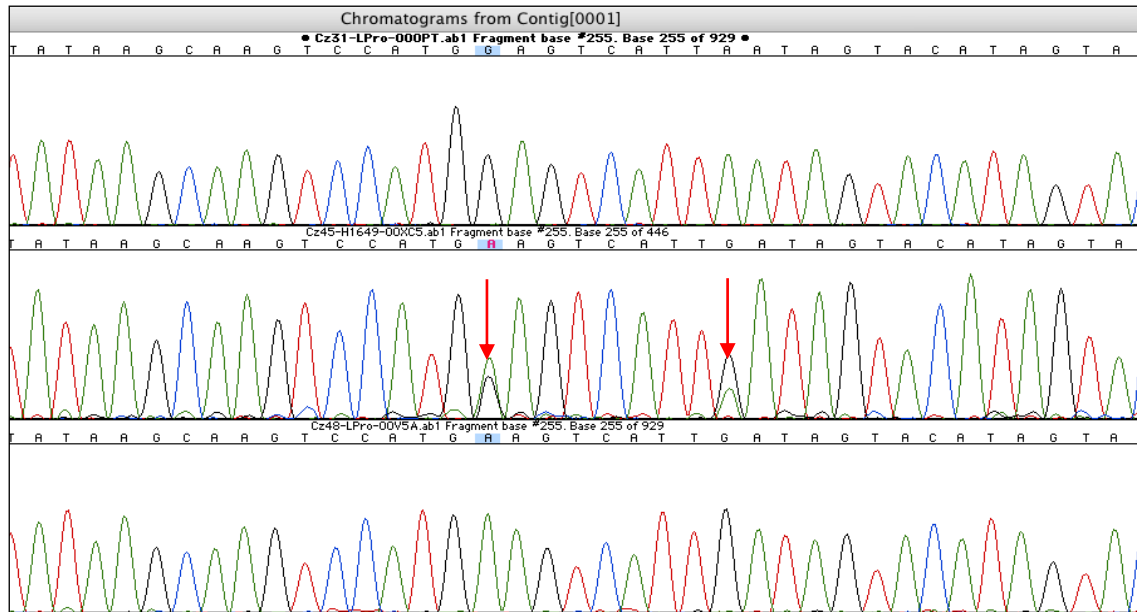


Figura 30. Los individuos superior (Cz31) e inferior (Cz48) muestran los dos haplotipos más comunes entre los corzos de la sierra de Guadarrama. El cromatograma del individuo representado en posición central (Cz45) sería heteroplásmico, presentando los picos de los otros dos haplotipos comunes (por la intensidad de las bandas o altura de los picos, parece que el haplotipo materno podría ser del tipo del de Cz48).

El rango de divergencias se situó entre 0.0 (entre los individuos con idéntico haplotipo) y 1,3%.

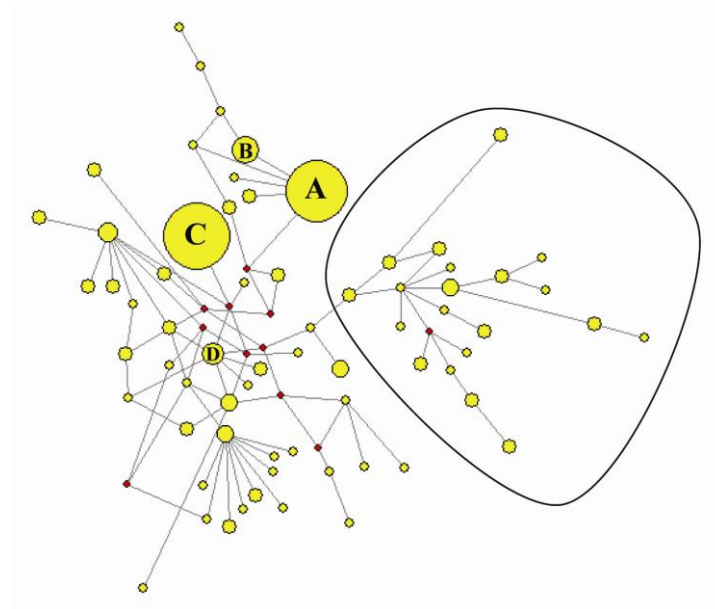


Figura 31. Representación gráfica de los haplotipos de la Sierra de Guadarrama, centro de la Península Ibérica, en el conjunto de las poblaciones europeas. Las poblaciones italianas aparecen dentro de un círculo como las más diferenciadas.

Posteriormente se analizó las relaciones entre estos haplotipos y otros previamente obtenidos por otros autores (Wiehler y Tiedemann, 1998; Vernesi et al., 2002; Randi et al., 2004), constatando el carácter único de algunos de éstos y su mayor o menor relación con otros haplotipos europeos (Fig.31 y 32). Además, en este estudio se pudo comprobarse la no monofilia (origen común) de los haplotipos ibéricos, ya que algunos aparecían más relacionados con otros haplotipos europeos que entre sí. Fundamentalmente, los linajes “A” y “B” se encuentran relacionados con otros analizados procedentes de España y Portugal, pero también con algunos de Francia e Italia. El grupo “C” se relaciona con haplotipos procedentes de Alemania, Polonia, Eslovaquia, Holanda, Serbia, Italia y Francia, mientras que también son en su mayoría procedentes del centro y norte de Europa los grupos hermanos del único individuo que representa el haplotipo “D”: de Francia, Alemania, Italia, Serbia, Suecia o Noruega. En la parte basal del árbol, junto con los representantes de *Capreolus pygargus*, elegidos como grupo externo, se encuentran distintos ejemplares procedentes de Italia, grupo que ya ha sido mostrado como el más diferenciado (Fig. 31).

Al combinar nuestra matriz de datos con los otros haplotipos del GenBank para diferentes poblaciones de la Península Ibérica, incluidos los analizados por Royo et al. (2007) (Fig. 33), se comprobó cómo los haplotipos de Guadarrama estaban relacionados tanto con haplotipos del “noroeste” de España, como con los del “centro-sur”. Los clados están divididos en cuatro grupos (Fig. 33).

En el grupo (1) se encuentran los individuos de los haplotipos “A” y “B”, coincidiendo exactamente una de las secuencias del estudio de Royo et al. (2007) con el haplotipo denominado “A”. El ejemplar que presenta ese haplotipo procede de Los Alcornocales (Cádiz). Sin embargo, hay otros próximos que proceden de Asturias (Sueve y Picos de Europa) y Asturias (Muniellos), así como de Burdeos, aunque esta última localidad no es determinante, ya que ha sufrido reintroducciones de distintas procedencias. El agrupamiento de haplotipos “C”, en el grupo numerado (2), se encuentra otro individuo secuenciado por Royo et al. (2007), que también procede de

la Sierra de Guadarrama (Segovia) o Montes de Toledo. En la base de este grupo aparece otro ejemplar del estudio citado.

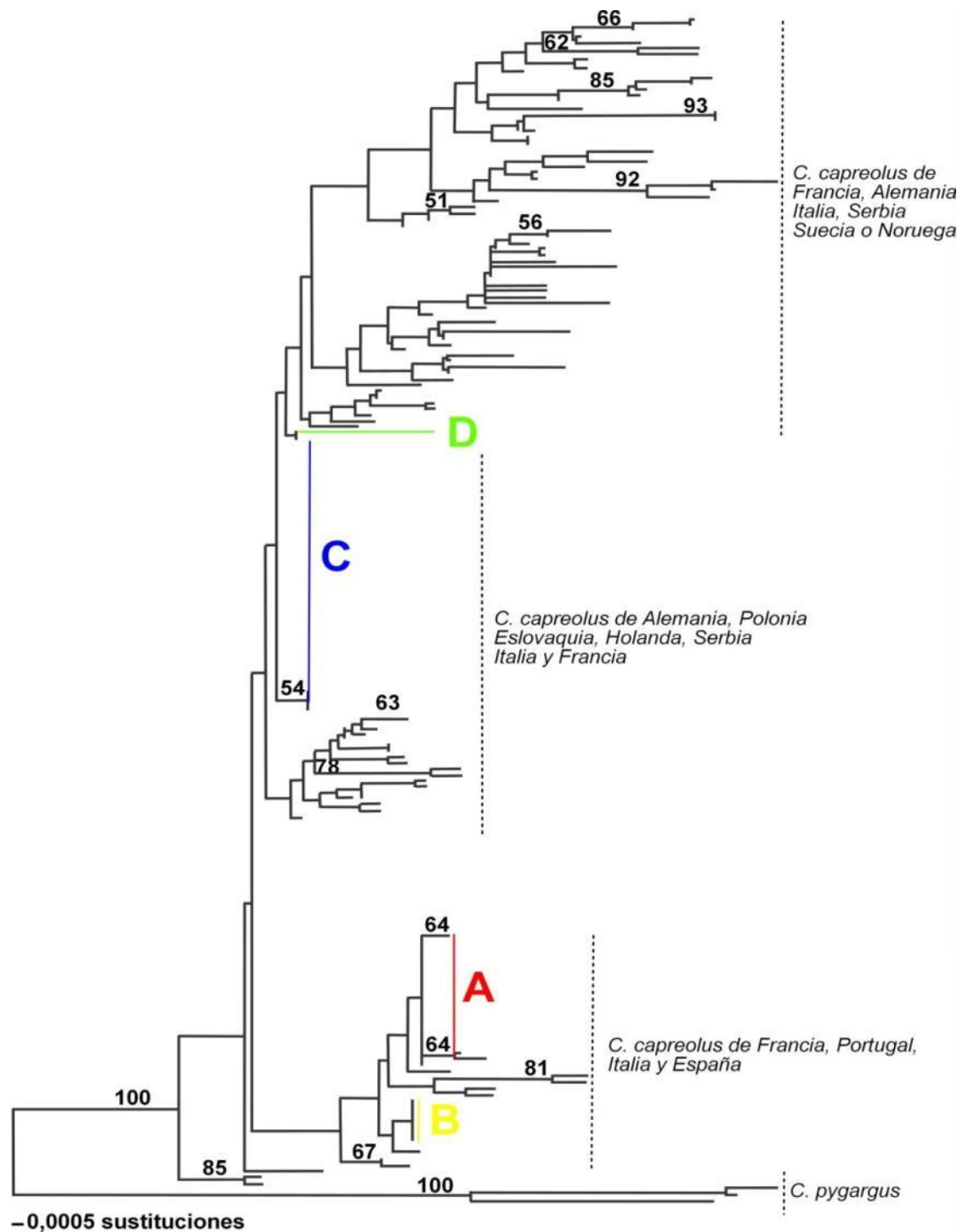


Figura 32. Árbol filogenético basado en los principios de *neighbour joining* para el conjunto de la especie con los haplotipos encontrados en la Sierra de Guadarrama y otros de diferentes poblaciones europeas (GenBank). Los números sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* por encima del 50%. A, B, C y D son la denominación de cada uno de los haplotipos encontrados en este estudio.

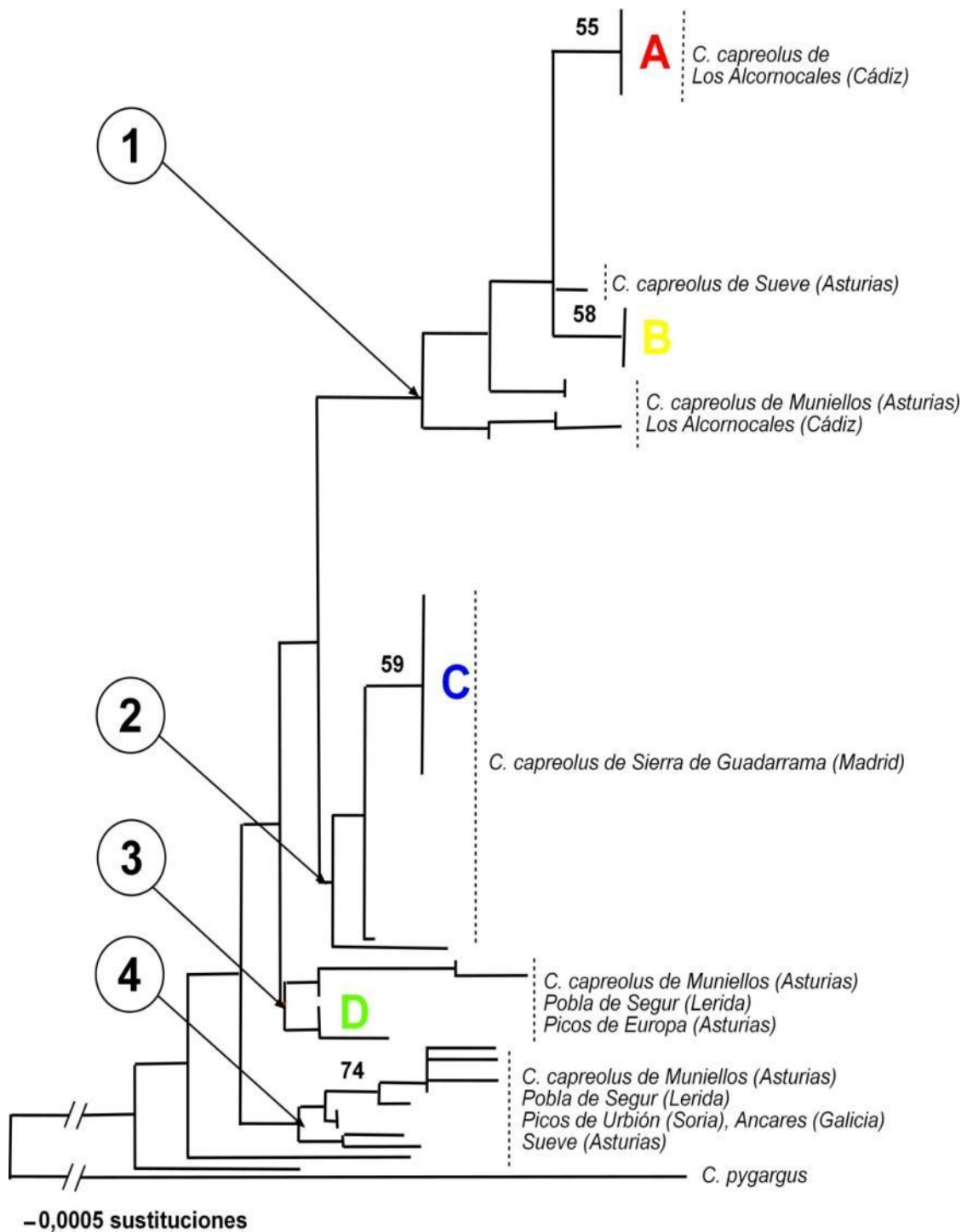


Figura 33. Árbol filogenético basado en principios de *neighbour-joining*, con los individuos analizados en este estudio (señalados con letras de colores) junto con otros de diferentes poblaciones de la Península Ibérica (GenBank). Los números dentro de los círculos señalan los 4 nodos principales y los situados sobre las ramas indican los valores de *bootstrap* por encima del 50%.

El grupo (3) incluye el único ejemplar que presentó el haplotipo “D”, que coincide con otros de Royo et al. (2007) procedentes de localidades norteñas, como Picos de

Europa o Muniellos, cuyo grupo hermano está constituido también por ejemplares de Picos de Europa, además de otros procedentes de Pobl de Segur (Lleida) y Burdeos. El agrupamiento marcado con un (4) está totalmente integrado por ejemplares procedentes del norte de la Península Ibérica.

3.3.2. *Análisis estándar de variabilidad genética con marcadores microsatélites*

Los parámetros que caracterizan el grado de polimorfismo del conjunto de microsatélites usados tanto para cada locus como a nivel poblacional se pueden ver en la tabla 6. De los 12 loci analizados 11 resultaron polimórficos, siendo el polimorfismo por tanto igual a 0,91. El número medio de alelos para la población fue 4,75 0,96, variando el número medio de alelos por locus polimórfico entre un mínimo de 2 (CSSM41, CSSM43 e IDVGA29) y un máximo de 13 (OarFCB304). El PIC ("Polymorphism Information Content") alcanzó su valor más bajo para uno de los loci menos polimórficos (PIC de IDVGA29= 0.1035) y el más alto para uno de los más polimórficos (PIC de BM757= 0,7465). La heterozigosis observada varió entre 0,11 (IDVGA29) y 0,73 (BM1706), siendo la media de 0,43.

La población se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) debido a 5 marcadores (BM757, HUI1177, BMC1009, IDVGA8 y OarFCB304) (Tabla 6). Los 5 tenían F_{IS} positivas (reflejando un déficit de heterozigotos). Esta fue la tónica general ya que la mayoría de los microsatélites utilizados tenían F_{IS} positivas, siendo únicamente los microsatélites BM1706 e IDVGA29 los que presentaban F_{IS} negativas, de -0,031 y -0,056 respectivamente, mostrando un exceso de heterozigotos. La F_{IS} poblacional calculada según Weir y Cockerham (1984) fue positiva e igual a 0,1115. La F_{IS} poblacional calculada según Caballero y Toro (2002) fue de 0,1224 (sin tener en cuenta el valor informativo de los distintos marcadores) y una vez promediado por el PIC fue de 0,1432, es decir, teniendo en cuenta la información proporcionada por cada marcador, el déficit de heterozigotos fue aún más marcado.

El valor medio de coancestría molecular para la población, que caracteriza el grado de similitud genética entre los individuos de una población fue 0,5067, sin tener

en cuenta el valor informativo de los distintos marcadores; el valor promediado por el PIC fue 0,3701.

Tabla 6. Resumen de los análisis básicos de variabilidad genética para la población de corzo. H_o , Heterozigosis observada; H_e , Heterozigosis esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} , se calculó según Weir y Cockerham (1984). En la última fila aparecen los valores del número medio de alelos, las heterozigosis medias y la F_{IS} calculada para todos los loci.

Variabilidad genética a través de marcadores microsatélites						
Nombredel locus	Rangoalélico	Nº dealelos	H_o	H_e	F_{IS}	p
BM1706	205-251	6	0,7303	0,7085	-0,031	n.s
BM757	193-295	8	0,3529	0,7829	0,551	<0,05
BM848	355-361	4	0,6235	0,6235	0	n.s
CSSM39	177-181	3	0,6046	0,6242	0,032	n.s
HUJ1177	198-226	5	0,5662	0,6990	0,191	<0,05
NVHRT48	86	1	0	0	--	n.s
BMC1009	277-281	3	0,1785	0,1851	0,036	<0,05
CSSM41	121-123	2	0,3222	0,3880	0,170	n.s
CSSM43	240-246	2	0,4588	0,4960	0,075	n.s
IDVGA29	140-148	2	0,1162	0,1102	-0,056	n.s
IDVGA8	207-227	8	0,6363	0,6851	0,072	<0,05
OarFCB304	151-193	13	0,6140	0,7543	0,187	<0,05
TOTAL	-	4,75	0,4337	0,5047	0,112	n.s

3.3.3. Análisis de la estructura genética con marcadores microsatélites

Las diferentes simulaciones con el programa Structure 2.1 determinaron que el logaritmo estimado de la probabilidad de los datos ($\ln \Pr(X/K)$) fue máximo cuando $K=1$, es decir, cuando se consideraba una única población. De hecho, cuando se realizaba un análisis factorial de correspondencias (AFC), donde los ejemplares iban a situarse en un espacio con un número de dimensiones igual al de los marcadores con los que se contaba, se observó cómo los ejemplares se diferencian escasamente, apareciendo superpuestos o solapados debido a la coincidencia en los genotipos (Fig. 34). En la parte inferior derecha de la figura 34, está un único individuo, que fuerza la mayor superposición de los demás ejemplares que comparten alelos distintos de ese ejemplar. Pues bien, esta diferenciación se debe únicamente a que ese ejemplar tenía un alelo propio en uno de los loci analizados.

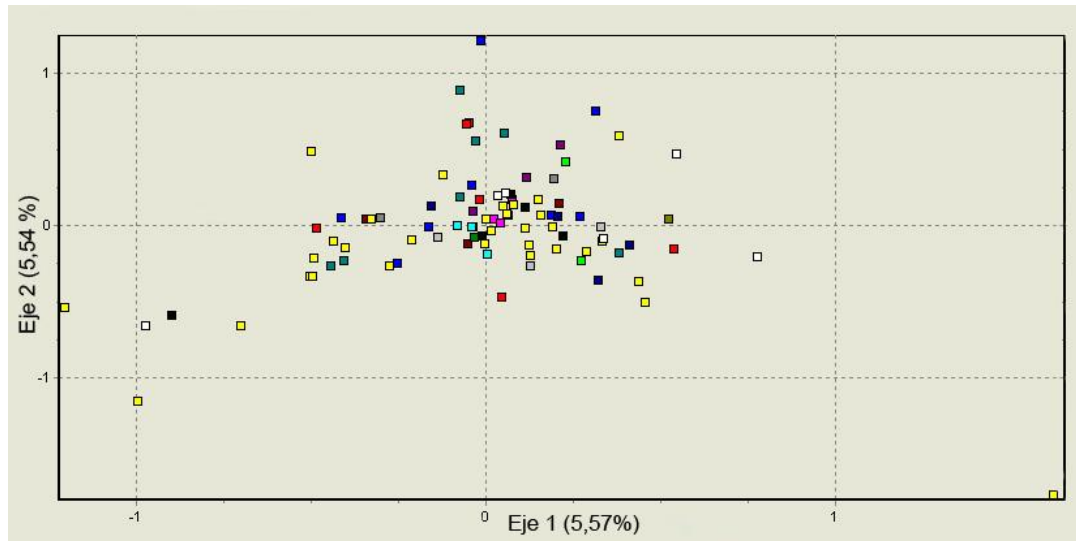


Figura 34. Análisis factorial de correspondencias (AFC) de los individuos de la Sierra de Guadarrama, determinado por los alelos detectados en 12 loci microsatélites.

Cuando se implementó el programa Geneland, las diferentes simulaciones dieron 1 o 2 poblaciones como la estructura más probable para los corzos de Guadarrama. Las probabilidades de encontrar 1 o 2 poblaciones fueron además muy similares en casi todas las simulaciones con valores de probabilidad cercanos a 0,5. Por esta razón, se testó la posibilidad de que existieran 2 poblaciones, reanalizando los datos para un número fijo de 2 poblaciones.

Los resultados obtenidos para 10 simulaciones fueron el 80% de las veces iguales, en ellos 13 individuos se asignaban a una población, y el resto a otra. Al situar geográficamente a estos individuos se vio que 5 pertenecían a la localidad de Rascafría, dos a Alameda del Valle, y uno a cada una de las siguientes localidades: Garganta de los Montes, Prádena del Rincón, Robledillo de la Jara, La Hiruela, Buitrago de Lozoya y Berzosa de Lozoya. Al analizar los genotipos de estos individuos se observó que varios de ellos no pudieron ser amplificados para 3 o más microsatélites, por lo que el efecto de los datos inexistentes era lo que los distinguía del resto.

3.4. Discusión

Los resultados extraídos del análisis de la variación en la región control del ADN mitocondrial han mostrado una relación múltiple de los ejemplares de corzo de la

Sierra de Guadarrama, tanto con los analizados en otros estudios de la Península Ibérica (Randi et al., 2004; Royo et al., 2007) como de Europa (Douzery y Randi, 1997; Vernesi et al., 2002; Randi et al., 2004). Esta relación podría interpretarse como un múltiple origen de la población, procediendo de la migración de ejemplares de distintos linajes hacia la Sierra de Guadarrama de forma natural por expansión de los rangos de distribución o bien por reintroducciones debidas al manejo humano. Si la migración hubiera sido natural por expansión de los rangos de distribución, la variación encontrada debería ser menor que en los centros de origen, ya que representaría el límite de distribución de dichas poblaciones, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos, estando la variación en el rango de la presentada en otros estudios e incluso en la parte superior de estos rangos (Wiehler y Tiedemann, 1998; Vernesi et al., 2002; Randi et al., 2004). Tampoco parece probable la posibilidad de reintroducciones por manejo humano en esta zona, ya que no hay constancia de ello en la Comunidad de Madrid (FIDA, 2008). Por lo tanto, la opción más plausible sería la aceptación de las teorías que abogan por la existencia de refugios en el Pleistoceno en la Península Ibérica (Gliozzi et al., 1997; Hufthammer y Aaris-Sørensen, 1998; Taberlet et al., 1998), siguiendo posteriormente rutas de recolonización hacia el norte de Europa (Hewitt, 1999) o manteniéndose como una zona geográfica aislada, no actuando como una fuente para recolonizaciones postglaciales (Lorenzini y Lovari, 2006).

Hay que indicar que pueden obtenerse distintas propuestas de las relaciones filogenéticas entre los distintos haplotipos cuando se toman los caracteres en su totalidad o parcialmente. Así, las secuencias consultadas de ejemplares procedentes de Europa (Douzery y Randi, 1997; Vernesi et al., 2002; Randi et al., 2004) y de la Península Ibérica (Royo et al., 2007) tuvieron diferentes longitudes por lo que se trató de tomar toda la información posible o reducir la matriz al número máximo de caracteres en común, obteniéndose distintas propuestas de relaciones entre los linajes detectados. Aun así, lo que siempre permaneció constante fue la relación de los haplotipos de Guadarrama, no sólo con otros ejemplares procedentes del centro, sur y norte de la península, en contra de lo esperado, según las conclusiones de Royo et al. (2007), sino también con ejemplares europeos de diferentes poblaciones.

La historia reciente de las poblaciones del centro de España, muestra evidencias de una importante reducción de efectivos durante el siglo XIX y primera mitad del siglo XX debido a la deforestación y la caza excesiva (Aragón et al., 1995; Tellería y Virgós, 1997; Gortázar et al., 2000), que pudieron haber dejado huella en los parámetros genéticos, pasando desapercibida para el análisis mitocondrial, por lo que el uso de marcadores microsatélites, más variables que los mitocondriales, podrían esclarecer la estructura genética de la población estudiada.

El análisis de la variabilidad genética a través de marcadores microsatélites indicó que probablemente haya una sola población, genéticamente homogénea. La población se desvió del equilibrio Hardy-Weinberg, por lo que violó alguna de las asunciones de tal principio (población infinita, reproducción panmíctica, inexistencia de migración, mutación o selección). La presencia de 5 marcadores con valores de F_{IS} positivos, implicó más homocigosis de la esperada, con referencia al equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que apuntó a una cierta endogamia. Este tipo de resultados también han sido encontrados en otras poblaciones estudiadas (Wang y Schreiber, 2001). Aun así, los resultados parecen indicar que, en comparación con otros estudios con metodologías similares (Coulon et al., 2005), la variabilidad genética de la población de Guadarrama, está algo empobrecida.

Dos de los microsatélites empleados en este estudio han sido usados anteriormente para analizar poblaciones españolas, el NVHRT48 y el BM757 (Royo et al., 2007). Para estos alelos, en las poblaciones muestreadas se encontraron 4 y 20 alelos, respectivamente, si bien en nuestro caso el BM757 fue el segundo marcador que presentaba mayor número de alelos (8), NVHRT48 resultó monomórfico, a pesar de este marcador muestra 4 alelos en otras poblaciones de la Península Ibérica NVHRT48.

El coeficiente de coancestría medio ayudó a analizar con mayor detalle estos resultados, puesto que al calcular la probabilidad de que dos alelos muestreados al azar del mismo locus en dos individuos distintos sean idénticos por estado, da una idea

de cuánto se parecen los individuos de una población. Los análisis realizados en otras poblaciones de corzo encontraron valores de coancestría medios que oscilaron entre 0,277 y 0,476 (Royo et al., 2007). Si comparamos estos resultados con el valor de coancestría molecular medio de nuestro estudio, el valor en la población de Guadarrama fue superior, lo que indicaría menor polimorfismo o mayor homocigosis, relacionado con una cierta endogamia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el conjunto de microsatélites utilizados en ambos estudios, así como los tamaños poblacionales, son distintos, por lo que es más adecuado comparar el coeficiente de coancestría corregido por la información que dan los alelos (PIC). En este caso, el valor entra dentro del rango encontrado por Royo et al. (2007), coincidiendo con el que estos autores encuentran para la población “central”, que incluye individuos de la Sierra de Guadarrama (vertiente segoviana) y Toledo (coeficiente de coancestría medio de 0,373).

Este resultado era relativamente predecible debido a las evidencias históricas antes expuestas. Sólo en el caso de que los distintos movimientos de recolonización hubieran surgido de otras poblaciones bien diferenciadas, o que distintos núcleos de la población de Guadarrama se hubieran mantenido aislados durante largo tiempo, se hubiera podido encontrar una estructura genética clara.

De forma paradójica, este resultado implicó por otro lado que el flujo génico entre los distintos grupos de corzo del ámbito de estudio fue adecuado y que, en principio, no hay grandes barreras que pudieran impedir la adecuada dispersión de los individuos. Además la aparición de un fenómeno extraño como la heteroplasmia, a parte de su interés desde un punto de vista genético, es un buen indicador de que individuos con ADN mitocondrial distinto, se están cruzando y por tanto, no existen barreras, ni geográficas ni genéticas, que lo impidan. Desde el punto de vista de su conservación, hay que tener en cuenta que aunque el corzo es un animal con una alta plasticidad ecológica (Tellería y Virgós 1997, Acevedo et al., 2005) se mueve en áreas pequeñas y es por ello muy susceptible a la fragmentación y a la presencia de barreras (Coulon et al., 2004).

En conclusión, el análisis combinado de dos tipos de marcadores enriqueció el conocimiento de la población estudiada. Datos procedentes de los genomas mitocondriales (de herencia materna) y nucleares (procedentes de ambos progenitores) se complementan aportando enfoques diferentes. Así, el genoma mitocondrial indicó una tasa relativamente alta de variación con 5 grupos diferentes de haplotipos, sin un origen común, estando relacionados filogenéticamente con diferentes poblaciones, tanto de la Península Ibérica como de Europa, por lo que no parece adecuado diferenciar subespecies de *C. capreolus* en la Península Ibérica, coincidiendo en este caso con Royo et al (2007) y con otros autores, tanto para las subespecies del norte y noroeste (von Lehmann and Sägeser, 1986; Fandos y Reig, 1993) como para las del centro y sur (Randi et al., 2004).

El gran número de muestras recogidas en la Sierra de Guadarrama y la situación de este sistema montañoso en el centro de la Península Ibérica, nexos de unión histórico de diferentes poblaciones, parece haber clarificado en gran parte el estado de la cuestión, sesgado en otros estudios por el escaso número de muestras analizadas en el Centro de la Península Ibérica.

CAPÍTULO 4

Horcajada-Sánchez, F.; Barja, I. & Boadella, M. (under review). Parasitic load and seroprevalence in wild populations of roe deer (*Capreolus capreolus*) from central Iberian Peninsula: influence of the coexistence with livestock, habitat and density. *Wildlife Biology*.

4. CARGA PARASITARIA Y SEROPREVALENCIA EN EL CORZO EN DOS AMBIENTES DE MONTAÑA DE LA SIERRA DE GUADARRAMA: INFLUENCIA DE LA COEXISTENCIA CON EL GANADO, EL HÁBITAT Y LA DENSIDAD

Resumen

Con el objetivo de conocer la carga parasitaria de endoparásitos, especialmente nemátodos broncopulmonares, así como la seroprevalencia de cinco agentes infecciosos (rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea vírica bovina, paratuberculosis, lengua azul y brucelosis) se han analizado 208 muestras (120 fecales y 88 de suero) procedentes de corzos de la Sierra de Guadarrama (centro de la Península Ibérica). Además, se evaluó la influencia de la coexistencia de la especie con el ganado, el tipo de hábitat y la densidad de corzos. Las muestras fecales fueron recolectadas en transectos realizados en pinares y robledales, mientras que las muestras de suero se obtuvieron de ejemplares obtenidos durante la época hábil de caza (abril-junio y septiembre). La carga parasitaria en las muestras fecales fue analizada mediante las técnicas de flotación y migración larvaria. Para los análisis serológicos se realizó un inmunoensayo enzimático usando la técnica ELISA. Los resultados del modelo lineal general indicaron que la presencia de ganado y el tipo de hábitat fueron los factores que explicaron la variación en la carga parasitaria de nemátodos broncopulmonares, siendo mayor en zonas con ganado y en pinares silvestres. La densidad de corzos no influyó en la carga parasitaria. La carga de endoparásitos en este estudio fue similar a la obtenida previamente para otras zonas de la Península Ibérica, aunque sensiblemente superior a la detectada en estudios con otras poblaciones europeas. Con respecto a las enfermedades infecciosas, se obtuvieron sólo muestras positivas a la paratuberculosis y a la diarrea vírica bovina. La prevalencia de estas enfermedades sugiere que el corzo tiene poco contacto con estos agentes virales y con enfermedades como la brucelosis, pero aumenta la seroprevalencia cuando se trata de enfermedades como la paratuberculosis, indicando que existe una circulación de la micobacteria por las poblaciones de rumiantes silvestres en la zona de estudio.

4.1. Introducción

Las patologías constituyen para la fauna silvestre un factor ecológico igual de importante que la depredación, la disponibilidad de recursos tróficos o la territorialidad (Krebs, 1995). Además, las interacciones entre el ganado y los ungulados silvestres han representado desde hace años un problema potencial en epidemiología (Pastoret, 1988; Gortázar et al., 2006; Barasona, 2015). A pesar de que se desconoce la importancia que el corzo (*Capreolus capreolus*) puede tener en la participación de algunas enfermedades de interés para el ganado, es uno de los ungulados silvestres que más ha incrementado su área de distribución y su abundancia en la Península Ibérica en las últimas décadas (Gortázar et al., 2000; Acevedo et al., 2005). En consecuencia, algunos factores de riesgo epidemiológico tales como el contacto con otros ungulados domésticos y silvestres, mayores frecuencias de contacto entre individuos o situaciones de mayor limitación de recursos, parecen haber ganado importancia recientemente (Gortázar et al., 2006; Barasona, 2015).

Los procesos parasitarios son una de las principales causas de enfermedad en los cérvidos europeos, siendo las nematosis broncopulmonares e intestinales y las distomatosis hepáticas las más importantes (Jeandel, 1969; Chroust, 1989). Sin embargo, no siempre queda demostrada claramente la etiología parasitaria de estas muertes, sugiriendo algunos autores que las infestaciones parasitarias severas son más bien una consecuencia de otros procesos (deficiencias nutricionales, estrés, subóptima calidad del hábitat, elevadas densidades) (Dingeldein, 1982; Sugar, 1997). En cualquier caso, el corzo parece ser uno de los cérvidos más sensibles a los procesos parasitarios, motivo por el cual son escasas las poblaciones de este ungulado mantenidas en cautividad (Dollinger, 1981). Además, es posiblemente el cérvido con mayor diversidad de formas parasitarias, al menos en lo referente a la infestación por nemátodos (Morales y Pino, 1993).

Aunque los estudios relativos a la epidemiología de endoparásitos en el corzo son escasos, algunos autores han descrito algunos factores que pueden influir en la carga parasitaria en el corzo, como las zonas de alimentación muy localizadas, las elevadas

densidades (Gortázar et al., 2007), la fragmentación del hábitat (San José et al., 1997), la presión turística (Lutz y Kierdorf, 1997), la disponibilidad de recursos tróficos (Sugar, 1991), las condiciones edáficas y de humedad (Panadero et al., 2001) o presencia de hospedadores intermediarios (Morrondo, 1985; Pato, 2011) (Fig. 35). Por este motivo los parásitos, particularmente los nemátodos, han sido utilizados como herramienta de monitorización sanitaria en poblaciones de ungulados silvestres (Eve y Kellogg, 1977; Sugar, 1997; Pato, 2011).

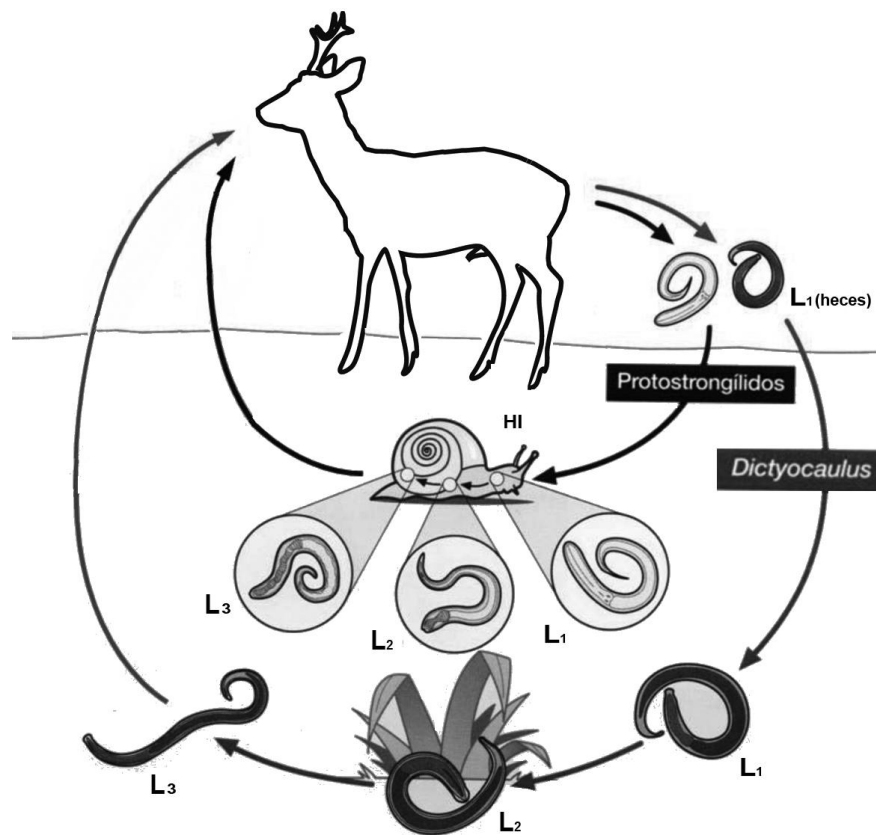


Figura 35. Ciclo biológico de los nemátodos broncopulmonares en que se observan las diferentes fases larvarias (L_{1,2,3}) y la participación de hospedadores intermedios (modificado de Pato, 2011).

En comparación con otros cérvidos de la Península Ibérica, como el ciervo (*Cervus elaphus*) y el gamo (*Dama dama*), el corzo parece tener menor importancia como reservorio de enfermedades infecciosas de especial relevancia (i.e. tuberculosis). El conocimiento existente sobre su estado sanitario también es más escaso, particularmente en comparación con el ciervo (Gortázar et al., 2012). Además, hay que tener en cuenta que, en la última década, la fauna silvestre ha estado relacionada con

brotes de enfermedades causantes de diversas emergencias sanitarias en la Unión Europea, como la lengua azul o la influenza aviar (Pato, 2011), lo que pone de manifiesto la importancia que tiene en la actualidad y en el futuro el control sanitario de los animales silvestres.

Las publicaciones a nivel internacional sobre patologías del corzo en la Península Ibérica son todavía muy escasas. En referencia a procesos de etiología vírica, aunque se conocen casos de corzos seropositivos (i.e. lengua azul, Ruiz-Fons et al., 2008a), son pocos los estudios de casos clínicos de virosis en corzos de la Península Ibérica. Con respecto a los herpesvirus y los pestivirus, la importancia de su vigilancia sanitaria no radica tanto en cómo la dinámica poblacional del corzo puede verse afectada, sino en su posible relación con problemas sanitarios objeto de control en el ganado doméstico (Deinhofer et al., 2004; Krametter et al., 2004). Como todos los cérvidos, los corzos son susceptibles a la infección por las micobacterias causantes de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*) y de la paratuberculosis (*Mycobacterium avium paratuberculosis*; MAP) (Machackova et al., 2004). Actualmente, existen abundantes evidencias que sugieren la importancia del corzo como reservorio de paratuberculosis en España (Boadella et al., 2010). Un estudio serológico en el noroeste de España sobre anticuerpos frente a MAP, utilizando el antígeno PPA3, reveló una prevalencia del 3% en el ganado (Diéguez et al., 2007). Sin embargo, apenas existe información sobre la paratuberculosis en corzos españoles (Boadella et al., 2010). Del mismo modo, la brucelosis, aunque ha sido citada de forma muy esporádica en corzos (Boch y Schneidawind, 1988), tampoco parece encontrar un reservorio relevante en la especie. Hasta la fecha, las analíticas llevadas a cabo en España no han permitido aislar ninguna cepa del género *Brucella*, por lo que las últimas hipótesis parecen indicar que los rumiantes silvestres son víctimas ocasionales de la brucelosis de la ganadería, en lugar de verdaderos reservorios (Muñoz et al., 2010).

4.2. Material y métodos

4.2.1. Ámbito de estudio

El estudio ha sido realizado en zonas forestales de la Sierra de Guadarrama, en la provincia de Madrid (centro de la Península Ibérica) (Fig. 36). El paisaje de montaña de esta zona está compuesto de bosques, matorrales y pastizales.

Los bosques de pino albar (*Pinus sylvestris*) se sitúan entre los 1.200 y 1.900 m.s.n.m. y, por lo general, tienen una baja diversidad arbustiva debido principalmente a los tratamientos forestales en la lucha contra incendios (Bailón et al., 2008). Las zonas que aún conservan sotobosque muestran la presencia de especies como piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*), enebro común (*Juniperus communis*) y cambroño (*Adenocarpus hispanicus*), enriquecido con alguna otra especie como el acebo (*Ilex aquifolium*) y pies aislados de roble melojo (*Quercus pyrenaica*).

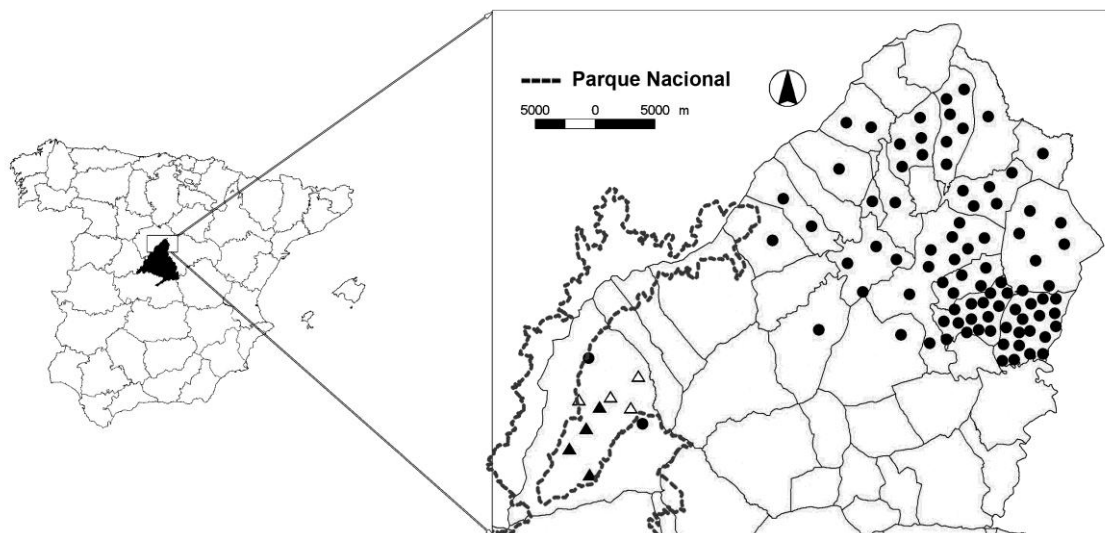


Figura 36. Localización del área de estudio en la Península Ibérica en la que se aprecian los municipios de la Sierra de Guadarrama donde fueron recolectadas las muestras fecales frescas en pinar (triángulos negros) y robledal (triángulos blancos). Los puntos negros indican la ubicación donde se obtuvieron las muestras de suero procedentes de corzos abatidos durante la temporada de caza.

Por su parte, los robledales ocupan el piso montano entre los 1.400 y los 1.700 m.s.n.m. marcando el límite superior del bosque caducifolio, salvo cuando el umbral

supramediterráneo superior es ocupado por los abedulares. Este límite asciende en las vertientes más lluviosas hasta los 1.750 m.s.n.m., descendiendo al acentuarse la xericidad hasta los 1.600 m.s.n.m. Posee un rico sotobosque asociado donde aparecen especies como zarzas (*Rubus* spp.), sauce negro (*Salix atrocinerea*), majuelo (*Crataegus monogina*), endrino (*Prunus spinosa*) y escaramujos (*Rosa* spp.) y abundantes zonas abiertas con setos, prados de ladera y prados húmedos de fondo de valle.

La abundancia de corzos en la zona está relacionada directamente con la presencia de áreas forestales de pinares y robledales (Sáez-Royuela y Tellería, 1991; Horcajada-Sánchez y Barja, 2015).

4.2.2. Obtención y conservación de las muestras fecales y suero

Para localizar excrementos frescos de corzo se establecieron 8 parcelas en los dos hábitats predominantes del área de estudio (4 en pinares y 4 en rebollares). Estos dos hábitats fueron seleccionados para el estudio debido a que presentaban las densidades de corzo más altas de todo el área de estudio (Horcajada, 2005) lo que facilitó la recolección de muestras fecales frescas. Además, para la selección de las zonas se consideró el tamaño territorial de la especie, que oscila de 5 a 300 ha (Zejda y Bauerova, 1985), a fin de incluir un número elevado de individuos en el estudio, minimizando de esta forma el sesgo que puede provocar la pseudo-replicación.



Figura 37. Agrupaciones de excrementos frescos de corzo detectados en el área de estudio.

La extensión de cada parcela de muestreo oscilaba entre 100 y 168 ($139 \pm 8,4$ ha). Cada parcela fue muestreada 1 vez al mes, a lo largo del periodo octubre-febrero de 2009 y 2010. En cada uno de los muestreos de 1 hora de duración se obtuvieron 3 muestras.

La recolección de muestras fecales se realizó por la mañana, dos horas después de la salida del sol, coincidiendo con uno de los picos de actividad de los corzos (Cederlund, 1989; Jeppensen, 1989), aumentando así la probabilidad de localizar heces frescas (Fig. 37). Cada vez que se detectaba un grupo de excrementos frescos de corzo, se guardaban 6 excrementos en un tubo cerrado el cual era almacenado en el frigorífico a 4°C un máximo de 1 mes, hasta su posterior análisis en el laboratorio. La no congelación de las muestras fecales permitió también realizar migraciones larvarias con el objetivo de detectar larvas de nematodos pulmonares (MAFF, 1986).

Con respecto a las muestras de suero, se obtuvieron en 20 municipios diferentes de la Sierra de Guadarrama (Fig. 36). La recolección de muestras se llevó a cabo durante tres años (2007-2009) en animales cazados durante la temporada de caza (abril-junio y septiembre), motivo por el cual se obtuvo una muestra mucho mayor de machos ($n= 85$) que de hembras ($n= 3$).

La sangre de los animales fue obtenida desde el corazón o la cavidad torácica durante las necropsias practicadas en el campo. Para obtener el suero, la sangre fue centrifugada inmediatamente *in situ* durante 10 min a 3000 r.p.m., almacenándose posteriormente a -20°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

4.2.3. Análisis de la carga parasitaria en muestras fecales

El análisis de la carga parasitaria de las muestras fecales de corzo se realizó a través de dos técnicas coprológicas: flotación y migración larvaria. Para la detección de ooquistes y huevos se utilizó la técnica de flotación y para la detección de larvas de nematodos pulmonares se utilizó la técnica de migración larvaria, usando la mitad de las muestras para cada técnica. En los recuentos se utilizaron cámaras de McMaster y

de Favatti y los resultados fueron expresados en ooquistes, huevos o larvas por gramo de heces húmedas.

La técnica de flotación se llevó a cabo según el método modificado de McMaster (Anon, 1986). Esta técnica se basa en que algunas formaciones parasitarias, como los ooquistes de coccidios y los huevos de cestodos y nematodos gastrointestinales, flotan en soluciones de densidad superior a la del agua ($>1,2 \text{ gml}^{-1}$). Los recuentos de huevos se determinaron en cada muestra de heces frescas homogenizando 1 g de muestra en 42 ml de agua. Posteriormente, la mezcla se filtró a través de un tamiz de 250 μm , y se repitió el proceso hasta obtener 10 ml de filtrado. Luego el filtrado se centrifugó a 1500-2000 r.p.m. durante 3 min, y se diluyó el sedimento en una solución salina hasta alcanzar los 15 ml. El preparado obtenido fue analizado en una cámara McMaster. Dicha cámara posee dos áreas de 0.15 ml, con líneas guía para asistir en el conteo. La muestra permaneció durante 5 min en reposo para permitir que los huevos subieran a la superficie. Finalmente, el número de huevos dentro de cada cuadrícula de la cámara fue contabilizado usando un microscopio óptico binocular a 10x.

La técnica de migración larvaria se realizó extrayendo entre 0,8 y 1 g de heces, utilizando el método de Baermann (Anónimo, 1973). Las larvas se cuantificaron en una cámara de recuento Favatti. Para determinar el número de larvas por gramo de heces (lpg), se dividió el número de larvas entre el número de gramos de la correspondiente muestra fecal. Además, las larvas fueron identificadas a nivel de género de acuerdo a su morfología y dimensiones lineales, utilizando las descripciones publicadas en otros estudios (Kutzer y Prosl, 1975; Vicente y Gortázar, 2001; Panadero et al., 2001).

4.2.4. Análisis serológico

Para el análisis serológico se utilizó, a excepción de las muestras de *Brucella*, la técnica ELISA (*Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay"*). El análisis para la detección de anticuerpos frente a *Brucella* spp. fue realizado mediante la técnica de aglutinación denominada Rosa de Bengala. Los test utilizados para cada agente infeccioso se reflejan en la tabla 7.

Tabla 7. Test utilizados en los análisis serológicos realizados en corzos de la Sierra de Guadarrama.

Test utilizados en los análisis serológicos		
Agente infecciosos	Test	Referencias
BVDv/BDv (Pestivirus)	ELISA; SERELISA® BVD p80 Ab. Mono Indirect, Synbiotics; Lyon, France.	Lillehaug et al., 2003
IBRv (Herpesvirus)	ELISA; SERELISA® IBR/IPV Ab. Mono Indirect Synbiotics; Lyon, France.	Gaffuri et al., 2006
Lengua azul-BT	Ingezim BTV Compac 2.0 12.BTV.K3®, Ingenasa; Madrid, Spain.	Conraths et al., 2009
<i>M. avium paratuberculosis</i>	ELISA; In-house	Reyes-Garcia et al., 2008
<i>Brucella</i>	Rose de Bengal	Blasco et al., 1994

4.2.5. Estimación de la densidad de corzos

La estima de densidades fue basada en el método de itinerarios o transectos mediante un muestreo estratificado (Horcajada-Sánchez y Barja, 2015). Así, en los dos tipos de hábitats del área de estudio, pinares (9.640 ha) y rebollares (8.737 ha) se realizaron recorridos que oscilaron entre 3 y 4 km durante el mes de octubre, muestreando un 20% de la superficie total de la zona de estudio (18.377 ha). Este método de censo presupone que a) los animales son detectados en su posición natural, no se han alejado o acercado a la línea de progresión, b) el observador no se confunde al calcular las distancias y c) los animales siempre son vistos si se encuentran en la misma línea de progresión. A partir de esta información, se calcularon las funciones de detección utilizando la metodología descrita en los muestreos realizados en el ámbito de estudio (Horcajada-Sánchez y Barja, 2015). Para estimar la densidad se utilizó el software Distance 6.0. (Research Unit for Wildlife Population Assessment, University of St. Andrews, UK).

4.2.6. Análisis estadísticos

La normalidad de las variables continuas fue analizada mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Cuando estas variables no se ajustaban a una distribución normal fueron Log₁₀ transformadas para realizar los posteriores análisis estadísticos.

La presencia o no de parásitos broncopulmonares excretados por gramo de heces húmedas fue analizada mediante una regresión logística binaria por pasos (Hosmer y Lemeshow, 1989), utilizando las variables predictoras hábitat (pinar/rebollar) y presencia de ganado (si/no) como factores fijos y, como covariable, la densidad de corzos (n° corzos/100 ha).

Además, se realizó un Modelo Lineal General (ANCOVA) para comprobar si la abundancia de parásitos broncopulmonares (variable respuesta) variaba en relación con el tipo de hábitat (pinar/rebollar), presencia de ganado (si/no) (factores fijos) y con la covariable densidad de corzos (n° corzos/100 ha). En este análisis los parásitos broncopulmonares excretados por gramo de heces húmedas fueron los únicos datos incluidos como indicador de la carga parasitaria (variable respuesta), descartando los nemátodos gastrointestinales y coccidios por su escasa incidencia en el estado sanitario del corzo en el área de estudio.

Para evaluar las enfermedades infecciosas se procedió a la realización de ANOVA usando como factor fijo la presencia de ganado (si/no), tanto ovino como bovino, y como variable respuesta los niveles de anticuerpos de las enfermedades infecciosas detectadas. Además, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para comprobar la relación existente entre las variables densidad de corzos, cabezas de ganado y niveles de anticuerpos de las enfermedades infecciosas.

El nivel de significación considerado para rechazar la hipótesis nula fue $p < 0,05$. Para llevar a cabo los análisis estadísticos se usó el software SPSS 22.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, U.S.A.).

4.3. Resultados

La densidad de corzos observada en el ámbito de estudio (número de corzos/100 ha) osciló entre $3,13 \pm 0,51$ ($CV\% = 16,4$, IC 95% = 2,26 a 4,34) en las zonas de pinar con ganado y los $6,9 \pm 1,51$ ($CV\% = 18,9$, IC 95% = 4,77 a 10,27) en las zonas de robledal sin ganado.

4.3.1. Carga parasitaria

El análisis de la carga parasitaria en 120 muestras fecales indicó la presencia de endoparásitos en el 90% de las muestras analizadas. El método de flotación reveló la presencia de huevos u ooquistes pertenecientes a 10 géneros diferentes de parásitos, mientras que con el método de migración larvaria, fueron detectados 3 géneros de nematodos broncopulmonares (Tabla 8).

Tabla 8. Carga media parasitaria del corzo en la Sierra de Guadarrama. Géneros de endoparásitos detectados por flotación (número medio de huevos u ooquistes/g de heces \pm SE) y de larvas detectadas por migración (número medio de larvas/g de heces \pm SE) en las muestras fecales.

Carga parasitaria y géneros de endoparásitos en los corzos de la Sierra de Guadarrama					
Grupos	Género	Huevos/g (Flotación)	Prevalencia (%)	N	Larvas/g (Migración)
Nematodos broncopulmonares	<i>Dictyocaulus</i>	13,4 \pm 4,2	28,7	87	15,8 \pm 8,4
	<i>Elaphostrongilus</i>	3,6 \pm 1,6	6,9	87	3,1 \pm 1,6
	<i>Varestrongilus</i>	2,2 \pm 0,9	26,4	87	15,9 \pm 7,4
	<i>Protostrongylus</i>	14,1 \pm 5,2	15,8	120	3,2 \pm 1,8
Nematodos gastrointestinales	<i>Trichostrongylus</i>	5,2 \pm 1,7	9,2	120	
	<i>Trichuris</i>	1,2 \pm 0,7	2,5	120	
	<i>Capillaria</i>	0,3 \pm 0,3	0,8	120	
Trématodos	<i>Fasciola</i>	1,6 \pm 1,0	2,5	120	
	<i>Dicrocoelium</i>	4,3 \pm 2,4	4,2	120	
Coccidios	<i>Eimeria</i>	13,1 \pm 4,8	13,3	120	

El modelo de regresión logística binaria indicó que la presencia de nemátodos broncopulmonares en las muestras fecales de corzo fue explicada por el tipo de hábitat donde fueron recogidas las muestras y, en menor medida, por la presencia de ganado (Tabla 9).

Además, la abundancia de nemátodos broncopulmonares en las muestras fecales de corzo no varió aleatoriamente. Así, el modelo lineal general realizado indicó que la presencia de ganado y el tipo de hábitat fueron los factores que explicaron el aumento de la carga parasitaria de nemátodos broncopulmonares. (Tabla 10). La interacción de las variables presencia de ganado * tipo de hábitat fue marginalmente significativa. Sin embargo, la densidad de corzos no influyó significativamente en las variaciones de la carga de nemátodos broncopulmonares (Tabla 10).

Las muestras fecales de corzo recolectadas en las zonas con presencia de ganado ($94,0 \pm 34,3$ huevos/g; $n = 42$) mostraron cargas parasitarias de nemátodos broncopulmonares significativamente más altas que las recogidas en las zonas sin ganado ($14,1 \pm 5,0$ huevos/g; $n = 45$) (Fig. 38A).

Tabla 9. Resultados del modelo de regresión logística binaria utilizado para explicar la presencia o no de nemátodos broncopulmonares en las heces de corzo, utilizando como factores fijos el hábitat (pinar/rebollar) y la presencia de ganado (sí/no) y como covariable la densidad de corzos (n° corzos/100 ha).

Modelo de regresión logística binaria				
Variables	E.T.	Wald	df	P
Presencia de ganado	0,608	3,696	1	0,055
Tipo de hábitat	0,626	6,174	1	0,013
Log10 densidad de corzo	4,251	0,018	1	0,892

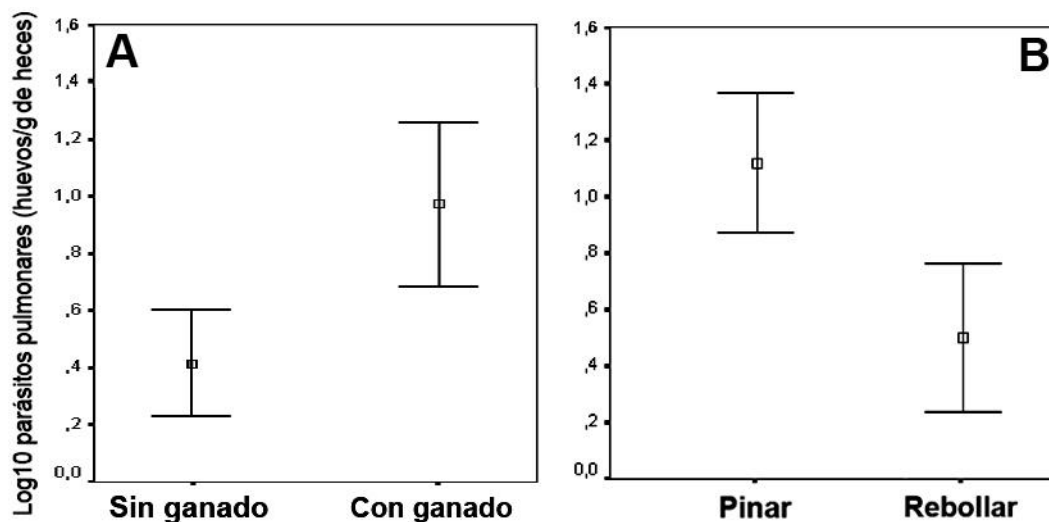


Figura 38. Número medio (\pm SE) de huevos de parásitos broncopulmonares en heces de corzo en relación con A) presencia de ganado y B) el tipo de hábitat.

Las cargas parasitarias de nemátodos broncopulmonares fueron significativamente más altas en pinares ($59,4 \pm 20,1$ huevos/g; $n = 45$) que en robledales ($45,4 \pm 28,6$ huevos/g; $n = 42$) (Fig. 38B).

Tabla 10. Resultados del Modelo Lineal General en el que se incluyeron como factores fijos la presencia de ganado, el tipo de hábitat y su interacción y la densidad de corzos como covariable para comprobar el efecto de los mismos sobre la carga parasitaria de nemátodos broncopulmonares en corzo.

Modelo lineal general			
Variables	F	df	P
Presencia de ganado	8,32	1	0,005
Tipo de hábitat	7,71	1	0,007
Log10 densidad de corzo	0,04	1	0,850
Presencia de ganado * Tipo de hábitat	3,31	1	0,072

4.3.2. Análisis serológicos

No se detectaron anticuerpos contra la lengua azul, la rinotraqueitis infecciosa bovina ni *Brucella*. Sin embargo, se observó una respuesta positiva contra pestivirus y frente a la paratuberculosis (Tabla 11).

Tabla 11. Número de muestras de suero con anticuerpos por cada agente infeccioso y porcentaje de seroprevalencia.

Seroprevalencias observadas en los corzos de la Sierra de Guadarrama		
Agentes infecciosos	Muestras positivas	Seroprevalencia
Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR)	0/88	0,0 %
Pestivirus (BVD / BD)	3/88	3,4 %
Paratuberculosis (MAP)	7/85	8,2 %
Lengua azul (BT)	0/62	0,0 %
Brucelosis	0/62	0,0 %

Al comparar los niveles de anticuerpos detectados en suero con la densidad de corzos no se observó ninguna relación significativa para la paratuberculosis (correlación de Pearson: $r = 0,06$, $p = 0,544$; $n = 85$), ni para pestivirus (correlación de Pearson: $r = 0,059$; $p = 0,584$; $n = 88$). Además, los niveles medios de anticuerpos frente a paratuberculosis no variaron en las zonas con ganado ovino (ANOVA: $F = 0,305$, g.l. = 1, $p = 0,582$; $n = 88$) ni con ganado bovino (ANOVA: $F = 0,009$, g.l. = 1, $p = 0,923$; $n = 87$). Del mismo modo, no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles medios de

anticuerpos frente a pestivirus en las zonas con ganado ovino (ANOVA: $F = 0,100$, g.l. = 1, $p = 0,753$; $n = 88$) ni bovino (ANOVA: $F = 0,332$, g.l. = 1, $p = 0,566$; $n = 88$).

4.4. Discusión

La escasa sintomatología que causan las infecciones parasitarias hace necesario recurrir con frecuencia a técnicas coprológicas para su detección. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el número de larvas hallado en heces no siempre se correlaciona directamente con la carga parasitaria, pudiendo existir variaciones, incluso diarias, en la eliminación de huevos y larvas de parásitos, cuya discontinuidad se explica por factores como la edad de los animales o la consistencia de las deyecciones debidas al régimen alimenticio (Díez-Baños et al., 1999). En consecuencia, en este estudio para evitar el sesgo debido a este tipo de variaciones, se recolectaron heces en ocho parcelas diferentes, distribuidas en dos hábitats, que fueron muestreadas hasta en cinco ocasiones a través de itinerarios. Además, este diseño aumentó la probabilidad de recolectar muestras de individuos diferentes y minimizó así la pseudo-replicación (Huber et al., 2003).

Al comparar la carga de parásitos broncopulmonares analizados en el área de estudio con la obtenida en otros estudios realizados en el corzo europeo, tanto en otras poblaciones españolas (Morrondo et al., 2009; Vázquez et al., 2010) como europeas (Kazlauskas y Puzauskas, 1974; Divine et al., 2002; Shimalov y Shimalov, 2003), se observó que las prevalencias de infección por *Dictyocaulus* sp. fueron inferiores a las halladas en el área de estudio, debido principalmente a la alta presencia de ganado vacuno en la zona de estudio (Oficina Estadística Española, 2009). Por el contrario, en los otros parásitos broncopulmonares analizados, las cargas de infección fueron menores que en otras poblaciones estudiadas (Tomanek, 1967; Kozakiewicz et al., 1986; Misiewicz, 1994; Cisek et al., 2003) para *Protostrongylus* sp. (Morrondo et al., 2009; Vázquez et al., 2010) y para *Varestrongylus* sp, ambos parásitos más vinculados a las áreas donde se crían ovejas y cabras (Pato, 2011). Estos ungulados no están presentes en el área de estudio y tampoco han sido encontrados en otros ungulados presentes como la cabra montés (*Capra pyrenaica*) (Refoyo, 2012).

La presencia de ganado influyó en la carga parasitaria de nemátodos broncopulmonares en general. Actualmente, el sistema de producción ganadero en la zona es básicamente extensivo y dedicado a la producción de carne, centrado principalmente en el ganado vacuno. El periodo de pastoreo en la montaña se inicia en primavera y dura hasta que el mal tiempo, en los meses de noviembre o diciembre, hace bajar en altitud al ganado. En invierno el ganado se mantiene en los pastos más bajos y se complementa su alimentación con forrajes y piensos. La recolección de muestras fecales se ha realizado en otoño e invierno, estación ésta en la que existe una diferencia muy marcada entre las zonas de invernada, con alta presión ganadera, y las zonas sin ganado, prácticamente sin competencia por parte de otros herbívoros (Díez-Guerrier, 1999). En estas zonas de invernada el corzo mantiene un contacto permanente con deposiciones de rumiantes domésticos, tanto en las zonas de pastizales donde se alimenta, como en el agua, lo que parece llevarle a un mayor riesgo de ingestión de larvas de parásitos broncopulmonares. Aun así, existe cierta controversia en este aspecto, en torno al género *Dictyocaulus*, ya que después de la revisión taxonómica de Durette-Desset et al. (1988), en algunos estudios recientes (Painceira, 2012) se concluye que no existe riesgo de infecciones cruzadas por nematodos broncopulmonares entre el ganado vacuno y el corzo, ya que éste último está infectado de forma específica por *Varestrongylus capreoli* y *Dictyocaulus noerneri*. Sin embargo, otros autores han citado *Dictyocaulus viviparus* tanto en corzos como en ganado ovino (Vetyska, 1980; Panadero et al., 2001; Omeragić et al., 2011). Además, la alta prevalencia de *Dictyocaulus* sp. encontrada en el ámbito de estudio en el ganado vacuno de la zona (Refoyo, 2012) y la alta densidad de vacas (13/100 ha) (Oficina Estadística Española, 2009) parece ser determinantes en la abundancia de *Dictyocaulus* sp. en la zona, en comparación con otras poblaciones españolas. Sin duda, las diferencias morfológicas son muy sutiles entre estas dos especies, por lo que alternativas como el análisis de ADN deberían ser aplicadas para resolver estas controversias (Höglund et al., 1999).

El otro factor determinante en la carga parasitaria de nemátodos pulmonares fue el tipo de hábitat. Los bosques de pino albar, aunque formados por un buen dosel

arbóreo, poseen un estrato arbustivo reducido con baja diversidad, debido principalmente a los trabajos de gestión forestal en la lucha contra incendios (Bailón et al., 2008). La mayor carga parasitaria en estas zonas puede estar relacionada con una mayor dificultad en la obtención de comida y, por lo tanto, con una dieta de peor calidad. La calidad del hábitat, especialmente en relación con la disponibilidad de los recursos alimentarios, ha sido identificado por algunos autores como un factor en el incremento de las enfermedades parasitarias en el corzo (Sugar, 1991). Sin embargo, los matorrales y pastizales asociados con bosque de roble son de mayor interés trófico para los ramoneadores como el corzo (Maillard y Picard, 1987), con especies como zarzas (*Rubus* spp.), sauce negro (*Salix atrocinerea*), majuelo (*Crataegus monogina*), endrino (*Prunus spinosa*) y escaramujos (*Rosa* spp.) (Maillard y Picard, 1987), proporcionando un valor energético y una mayor cobertura en los momentos más delicados. Se ha comprobado en este aspecto que los hábitos de especies ramoneadoras (Tixier y Duncan, 1996) pueden reducir el riesgo de parasitación, tanto por minimizar el contacto con especies de parásitos presentes en el suelo, como por la alimentación de brotes de plantas que poseen compuestos secundarios con efectos antihelmínticos, como taninos, que por lo general son ingeridos en el ramoneo (Hoste et al., 2008), como también se ha demostrado en otras especies de cérvidos (Hoskin et al., 2000). Además, en zonas de roble la presencia de áreas abiertas con prados y setos también podría explicar las diferencias en la carga parasitaria entre los dos hábitats. De hecho, los corzos que viven en las zonas más abiertas y fragmentadas mantienen una fuerte dependencia con este tipo de paisaje (Hewison et al., 2001), utilizando los pocos bosquetes rodeados de setos donde el ramoneo incorporara estos metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas antes descritos (Navarro-González, 2011).

Abundando más si cabe en las diferencias entre los dos hábitat analizados, algunos autores (Panadero et al., 2001) atribuyen este tipo de resultados a las condiciones edáficas y climáticas que intervienen en la presencia de los moluscos, que actúan como huéspedes intermedios en los ciclos biológicos de los nematodo y de otros parásitos, así como las diferencias en la supervivencia de las larvas según el tipo

de suelo. Las zonas de pino y roble del ámbito de estudio muestran diferencias con respecto a la presencia de moluscos (Aparicio, 2006) siendo más abundantes en las zonas altas, donde se encuentra los hábitat de pinar. Además, la presencia de los dos trematodos hallados en las muestras de corzo analizadas, *Fasciola* sp. y *Dicrocoelium* sp. También pudo estar mediada por la presencia de este tipo de moluscos. En este aspecto, Morrondo et al. (2005) encontraron que, en las zonas a mayor altitud con temperaturas más bajas, la prevalencias de infección por *Dicrocoelium* sp. fueron mayores que en otras zonas, condicionados por la abundancia de moluscos en estos entornos.

Además, en consonancia con otros estudios (Hugonnet y Cabaret, 1987), las diferencias en las densidades de corzo del área de estudio no fueron un factor determinante en la abundancia de nematodos broncopulmonares. Aun así, la presencia de ganado si aumentó las densidades de herbívoros en general, lo que influyó definitivamente en el riesgo de infecciones. Aunque en otros estudios se ha observado que los cambios demográficos y geográficos experimentados por el corzo en las últimas décadas pueden aumentar el riesgo de contraer enfermedades a través del aumento de las tasas de contacto intraespecífico y con otras especies (Gortázar et al., 2006; Oleaga et al., 2008), las densidades encontradas en las poblaciones de corzo del presente estudio, no constituyeron un factor determinante del incremento de endoparásitos ni de la prevalencia de enfermedades infecciosas.

En general, se puede decir que los corzos estudiados en la Sierra de Guadarrama no presentaron contactos destacados con agentes patógenos de importancia en sanidad animal. Los resultados del presente estudio confirman que el corzo muestra una menor prevalencia de anticuerpos contra agentes virales y bacterianos (Gaffuri et al., 2006) en comparación con otros rumiantes silvestres (Ruiz-Fons et al., 2008a, b). Esto podría deberse a diferencias en el comportamiento social entre corzos y otros rumiantes silvestres, como ciervos y gamos (Boadella et al., 2010), con menor número de contactos intraespecíficos debido a su comportamiento a la hora de alimentarse como selector y ramoneador (Linden et al., 2010), sobre todo en zonas como la Sierra

de Guadarrama con densidades medio-bajas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la casi totalidad de las muestras de suero del presente estudio correspondían a machos y, por tanto, los resultados obtenidos pueden mostrar un sesgo con respecto a la situación de salud de la población de corzos en la Sierra de Guadarrama.

La prevalencia de anticuerpos para la diarrea vírica bovina (3,4%) en la Sierra de Guadarrama fue baja y similar a la observada en otros estudios de corzo (Olde Riekerink et al., 2005; Marco, 2009). Estos resultados demuestran que los corzos estudiados han estado en contacto con pestivirus. Aunque en cérvidos las rutas de infección no están todavía claras, se sospecha que la mayoría de pestivirus son eliminados en secreciones y excreciones corporales (Meyling et al., 1990).

La nula prevalencia de anticuerpos contra el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina es reflejo del aislamiento relativo del corzo a nivel social, con tamaños asociativos muy bajos (Mateos-Quesada, 1998) en comparación con otros cérvidos, comportamientos éstos que no favorecen un contacto estrecho entre animales y, por tanto, disminuyen la probabilidad de infección.

La paratuberculosis fue la enfermedad con una seroprevalencia mayor en los corzos de la Sierra de Guadarrama. Boadella et al. (2010), en un estudio realizado en ocho poblaciones españolas, sugieren que el contacto con MAP puede ser generalizado en las poblaciones de corzo. Por ello, es probable la posible participación del corzo en la epidemiología de esta enfermedad o al menos como indicador potencial de contaminación ambiental, como ya se ha sugerido para otras enfermedades (Gamarra et al., 2008). Aun así, en otro estudio realizado en León en varias reservas nacionales de caza, donde tanto rumiantes domésticos como silvestres comparten pastos en verano, Gutiérrez (2000) obtuvo una seroprevalencia del 0,7% en corzo, en claro contraste con las observadas en el ganado doméstico de la zona (67,6% de los rebaños ovinos y el 56,2% de los caprinos). Teniendo en cuenta la transmisión fecal-oral del agente etiológico y su resistencia en el medio, los datos parecen indicar

que la importancia de la relación rumiantes domésticos-silvestres es mucho más escasa de lo esperado (Pato, 2011).

No se obtuvo ningún caso positivo de contacto con lengua azul en las muestras de suero de los corzos de Guadarrama, a pesar de ser detectada en otros rumiantes silvestres, como el ciervo, en el Sistema Central (Ruiz-Fons et al., 2008a) siendo una enfermedad transmitida por vectores, a priori menos dependiente de la conducta social y de los hábitos alimentarios (Boadella et al., 2010).

Con respecto a la brucelosis, aunque ha sido citada de forma ocasional en corzos europeos (Boch y Schneidawind, 1988), no se ha detectado ningún contacto con los corzos de la Sierra de Guadarrama. Hasta la fecha, los análisis llevados a cabo en España no han permitido aislar ninguna cepa del género *Brucella* (Boadella et al., 2010; Muñoz et al., 2010), estando prácticamente erradicada (<http://rasve.mapa.es>), siendo los rumiantes silvestres víctimas ocasionales de la brucelosis, más que reservorios verdaderos de la enfermedad (Muñoz et al., 2010).

En definitiva, los datos aportados por el presente estudio en relación a la prevalencia de enfermedades infecciosas, están en consonancia con lo observado para el corzo en el resto de España (Boadella et al., 2010). Como se ha constatado en este estudio, los análisis serológicos han demostrado ser una herramienta fundamental para la monitorización de enfermedades infecciosas. No obstante, sería recomendable validar los tests ELISA específicamente para el corzo (Stallknecht, 2007), aun asumiendo que el suero de corzo posiblemente no varía en comparación con el de vaca, oveja o cabra.

En conclusión, se puede indicar que el corzo parece tener poco contacto con la mayoría de los agentes virales estudiados y *Brucella*, pero aumenta la seroprevalencia de otras enfermedades infecciosas como la paratuberculosis, lo que podría indicar que la prevalencia de anticuerpos en el corzo podría estar determinada en gran medida por factores ambientales, posiblemente debido a la supervivencia del patógeno en el medio ambiente y a la circulación de la bacteria en las poblaciones de rumiantes

silvestres de la Sierra de Guadarrama, como ya se demostró previamente para el ciervo en la Península Ibérica (Reyes-García et al., 2008).

CAPÍTULO 5

Horcajada, F.; Barja, I.; Escribano-Ávila, G.; Lara-Romero, C. & Virgós, E. (under review). Effects of habitat, extensive livestock and parasite load on faecal cortisol metabolites levels in a wild population roe deer (*Capreolus capreolus*). *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy*.

5. EFECTO DEL HÁBITAT, GANADERÍA EXTENSIVA, CAZA Y CARGA PARASITARIA SOBRE LA RESPUESTA DE ESTRÉS FISIOLÓGICO EN UNA POBLACIÓN DE CORZOS EN LA SIERRA DE GUADARRAMA

Resumen

El análisis de los metabolitos de los glucocorticoides fecales es una técnica no invasiva con un enorme potencial en los estudios de la vida silvestre, que no requiere la captura de los animales estudiados y que ha sido utilizada en numerosas especies de vertebrados, incluyendo los ungulados. La evaluación de los efectos del hábitat, la presencia de ganado y la carga parasitaria sobre la respuesta de estrés fisiológico en corzo en la Sierra de Guadarrama, ha sido realizada mediante la cuantificación de metabolitos del cortisol fecal. Las concentraciones de metabolitos del cortisol fecal fueron significativamente mayores en los bosques de pino que en los de roble, evidenciando una falta de adaptación del corzo a estos bosques de coníferas. Sin embargo, la ganadería extensiva no fue un factor determinante en el aumento de los niveles de estrés fisiológico para el corzo, aunque su impacto en un hábitat desfavorable para la especie como los pinares, sí influyó significativamente en el aumento de la secreción de metabolitos del cortisol en las muestras fecales recolectadas en estas zonas. Aunque la carga de nematodos broncopulmonares fue mayor en las zonas con presencia de ganado, no se observó que la carga parasitaria influyera en el aumento de los niveles de glucocorticoides. Por tanto, la respuesta de estrés fisiológico en el corzo en el área de estudio se vio incrementada en aquellos hábitats más manejados por el hombre y con peor calidad de alimento como los pinares. Los resultados obtenidos, sin duda, ayudarán en la toma de decisiones de gestión de la especie el área de estudio.

5.1. Introducción

Los vertebrados poseen la capacidad de adaptarse a los cambios del medio donde viven a través de modificaciones fisiológicas, morfológicas y comportamentales (Möstl y Palme, 2002). Una de las adaptaciones frente a estímulos adversos son las respuestas fisiológicas, que incluyen la activación del eje corticotropo (HPA: hipotalámico-

pituitaria-adrenal) y la síntesis y secreción subsiguientes de glucocorticoides por la corteza adrenal (Axelrod y Reisine, 1984; Stewart, 2003). Para evaluar estas respuestas, numerosos estudios han relacionado los niveles de estrés con las concentraciones de glucocorticoides o de sus metabolitos en la orina o en las heces, utilizándolas como indicadores de la condición física bajo diferentes grados de exposición a factores estresantes (Romero y Wikelski, 2001; Boonstra, 2004; Gobush et al., 2008; Busch et al., 2011). Este enfoque se basa en el hecho de que la respuesta de estrés es el vínculo entre la percepción del medio ambiente por parte de un individuo y la fisiología (McEwen y Wingfield, 2003).

Cuando los factores estresantes actúan a corto plazo se secretan glucocorticoides y se activa el metabolismo de la glucosa, ayudando al organismo a hacer frente a las situaciones adversas, a través de una respuesta adaptativa y beneficiosa para el organismo (“eustrés”). Sin embargo, si dicha respuesta es a largo plazo (“distrés”) la retroalimentación negativa se desajusta y la respuesta de estrés se vuelve tan nociva como el propio agente estresante (Boonstra, 2005), pudiendo dar lugar a patologías como la supresión reproductora, la supresión inmunológica, la aparición de úlceras, la reducción de la condición física por desajustes en el metabolismo de la glucosa o la atrofia tisular, entre otras muchas (Sapolsky, 1992; Sapolsky et al., 2000; Stewart, 2003). Estas consecuencias aumentan la vulnerabilidad de los animales y pueden poner en peligro su supervivencia y su capacidad reproductiva (Lochmiller y Deerenberg, 2000) (hipótesis de “Cort-Fitness”, Bonier et al., 2009).

Las nuevas técnicas fisiológicas, permiten la evaluación de algunos de los problemas más comunes en la conservación de especies silvestres (Wikelski y Cooke, 2006). En este aspecto, el uso de los niveles de glucocorticoides como indicadores de estrés fisiológico, se ha revelado como una herramienta valiosa en biología de la conservación, ecología evolutiva y en los estudios sobre bienestar animal, proporcionando información de gran valor para la conservación de especies a largo plazo (Creel et al., 2002).

Hasta hace pocos años, para el empleo de este tipo de técnicas se utilizaban muestras procedentes de plasma (Terlouw, 1997). La recolección de dichas muestras es un método invasivo, pues requiere la captura y manejo de los animales (Young et al., 2004), produciendo además estrés en los mismos (“estrés de captura”). Además, la secreción de glucocorticoides en sangre varía a lo largo del día exhibiendo patrones secretores pulsátiles, por lo que las concentraciones de estas hormonas en plasma son muy variables y no son representativas de efectos estresantes a largo plazo (Monfort et al., 1993; Harper y Austad, 2000). Como alternativa a esta técnica, desde hace varios años se ha generalizado la cuantificación de estas hormonas en muestras fecales, como método no invasivo con un enorme potencial en el estudio de la vida silvestre (Wasser et al., 2000). Su uso evita la manipulación de los animales objeto de estudio, evitando el estrés de captura (Millspaugh et al., 2002; Möstl y Palme, 2002) y cuantifica la cantidad total de metabolitos excretada, reflejando de manera más fiable el patrón de secreción de glucocorticoides a largo plazo (Harper y Austad, 2000; Palme et al., 2005). El uso de muestras fecales para cuantificar los niveles de estrés fisiológico ha sido utilizado en varias especies de vertebrados (Barja et al., 2007, 2008; Navarro-Castilla et al., 2014; Piñeiro et al., 2015), incluyendo los ungulados (Graham y Brown, 1996; Dehnhard et al., 2001; Schatz y Palme, 2001; Touma y Palme, 2005; Taillon y Côté, 2008; Escribano-Ávila et al., 2013).

La interpretación de los niveles de metabolitos de los glucocorticoides fecales requiere información complementaria que debe ser tomada en cuenta, como el estado reproductor de los individuos y otras funciones fisiológicas como la inmunidad y la alimentación (Romero, 2004; Escribano et al., 2013). El papel de los glucocorticoides en la reproducción es fundamental según la hipótesis de “Cort-Adaptation” (Bonier et al., 2009), según la cual existiría una relación positiva entre la condición física y el nivel de glucocorticoides durante el período reproductivo. Con respecto a la relación entre estrés fisiológico y estado inmune, también ha sido analizada en numerosos vertebrados, fundamentalmente a través de la carga parasitaria (ciervos: Smith, 1998; aves: Shutler et al., 2004; ratones: Brown y Fuller, 2006; peces: Mazon et al., 2006; cabras: Luzón et al., 2008).

De manera específica, la respuesta de estrés fisiológico en el corzo está poco estudiada (Dehnhard, 2001; Escribano-Ávila et al., 2013), a pesar de ser una especie con una amplia área de distribución en Europa (Fruzinski et al., 1983) y de interés cinegético.

En consecuencia, la realización de este tipo de estudios en las poblaciones naturales de corzo adquiere actualmente importancia, debido al gran interés social en la gestión de esta especie, ya que, tanto en España como en el resto de Europa, se ha incrementado sustancialmente su área de distribución (Cederlund et al., 1998; Radeloff et al., 1999). Además, superdepredadores como el lobo (*Canis lupus*) se han visto beneficiadas por el aumento de la abundancia de corzos, base de su dieta en muchas zonas (Mattioli et al., 2004; Gazzola et al., 2005; Barja, 2009).

5.2. Material y métodos

5.2.1. Ámbito de estudio

El estudio fue realizado entre octubre de 2009 y febrero de 2010 en la Sierra de Guadarrama, en el centro de la Península Ibérica (Fig. 39). Actualmente, parte del ámbito de estudio se encuentra incluido dentro del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama. Las muestras fueron recopiladas en bosques de pino albar (*Pinus sylvestris*) y rebollares (*Quercus pyrenaica*). Los bosques de pino albar se encuentran entre los 1.200 y 1.900 m. de altitud y muestran un sotobosque con especies como el piorno serrano (*Cytisus oromediterraneus*), el enebro común (*Juniperus communis*) o el cambroño (*Adenocarpus hispanicus*) (Rivas-Martínez, 1987). Los robledales ocupan la zona de montaña entre 1.700 y 1.400 m.s.n.m., extendiéndose por toda la sierra de Madrid.

La abundancia de corzos en el área de estudio es baja y está directamente relacionada con el medio forestal (Sáez-Royuela y Tellería, 1991; Horcajada-Sánchez y Barja, 2015). Los bosques de pinos albar, aunque con un buen dosel arbóreo, tienen una baja diversidad arbustiva debido principalmente a los trabajos de gestión forestal orientados a la lucha contra incendios (Bailón et al., 2008). Sin embargo, los rebollares,

poseen un estrato arbustivo muy variado y abundante con especies como las zarzas (*Rubus spp.*), el sauce negro (*Salix atrocinerea*), el majuelo (*Crataegus monogina*), el endrino (*Prunus spinosa*) y los escaramujos (*Rosa spp.*).

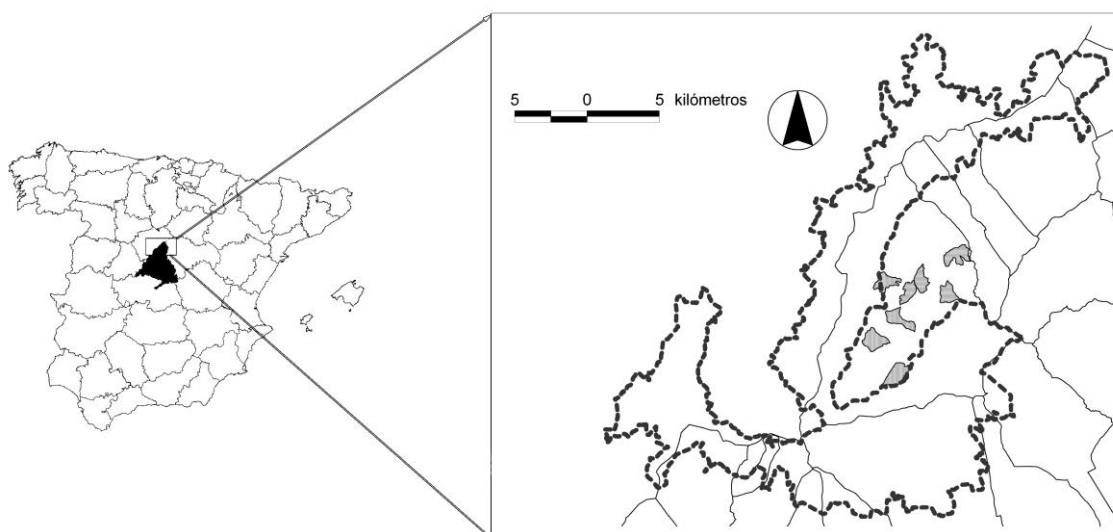


Figura 39. Localización del área de estudio en la Península Ibérica en el que se aprecian las parcelas utilizadas para el muestreo de excrementos de corzo en la Sierra de Guadarrama.

La caza del corzo practicada en el área de estudio, se pueden definir como de tipo tradicional y está desarrollada a través de la modalidad de rececho. Esta modalidad es realizada por un cazador aproximándose al animal sin ser descubierto, de la manera más sigilosa posible, con el viento en contra y aprovechando las querencias y movimientos de los animales, normalmente al amanecer o durante el ocaso.

5.2.2. Obtención y conservación de las muestras fecales

Para la recolección de muestras fecales frescas de corzo se establecieron ocho parcelas de muestreo en bosques de pino albar ($n= 4$) y roble melojo ($n= 4$). En el diseño de los muestreos se tuvo en cuenta el riesgo de sobre o sub-representación de los mismos ejemplares, en detrimento de otros, detectado por otros autores en este tipo de muestreos (Huber et al., 2003), por lo que las parcelas tuvieron un tamaño entre 100 y 168 ha ($139 \pm 8,4$ ha), superficie por encima del tamaño medio de los territorios de machos y hembras de corzo (Zejda y Bauerova, 1985; Guillet et al.,

1996). Además, en el caso de las hembras, estos territorios se superponen (Blottner et al., 1996), por lo que varias hembras y sus crías del año pueden compartir el área de campeo. Sumado a esto, durante la temporada de otoño e invierno se observan en el ámbito de estudio los grupos con mayor número de ejemplares (FIDA, 2008), incluyendo machos, por lo que en base a estas evidencias, nuestras parcelas pueden albergar un número considerable de corzos, de acuerdo con las densidades locales (Horcajada, 2007). En estas condiciones, Huber et al. (2003) compararon los niveles fisiológicos de una población con muestras conocidas y anónimas y no encontraron diferencias significativas.

Tabla 12. Diferencias morfológicas propuestas por Bang y Dahlstrom (2003) para discriminar los excrementos de corzo, liebre, conejo y oveja.

Diferencias morfológicas de excrementos	
Especie	Forma
Corzo	Cilíndricos con un extremo redondeado y otro puntiagudo
Liebre	Esféricos, aplastados y duros
Conejo	Redondos
Oveja	Cilíndricos aplastados

Cada parcela fue intensamente muestreada durante el periodo de estudio a través de 15 recorridos a pie. Esta metodología ha sido utilizada con éxito por otros autores en estudios de estrés fisiológico con la especie (Escribano-Ávila et al., 2013). Los recorridos fueron realizados a las 8h de la mañana, coincidiendo con los picos de actividad de la especie durante la salida del sol (Cederlund, 1989; Jeppensen, 1989). De cada grupo de excrementos frescos (con una superficie brillante verdosa y sin signos de deshidratación) se recogieron 12 cagarrutas, 6 para el análisis de glucocorticoides y 6 para el análisis coprológico de parásitos. Las muestras destinadas al análisis de glucocorticoides fueron homogeneizadas en un recipiente antes de congelarlas siguiendo el protocolo de Barja et al. (2012). Para evitar confundir los excrementos de corzo con los de otras especies del área de estudio de características similares, se siguieron los criterios de Bang y Dahlstrom (2003) (Tabla 12).

Este diseño de muestreo, garantiza que las muestras recogidas eran frescas y que los niveles de glucocorticoides fecales no se vieron alterados (Abáigar et al., 2010; Escribano-Ávila et al., 2013). Algunos autores han sugerido que las condiciones ambientales y la actividad bacteriana podrían provocar variaciones en las concentraciones de glucocorticoides fecales (Möstl et al., 1999; Möstl et al., 2002; Millpaugh y Washburn, 2004). Sin embargo, en estudios experimentales recientes con corzos, se demostró que el tiempo transcurrido entre la recogida y la congelación de las muestras fecales, la temperatura o la humedad, no tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de cortisol en heces (Barja et al., 2012).

Figura 40. Formularios en la base de datos SprinDB donde se muestran los datos almacenados en campo para cada muestra fecal recolectada.

Los datos de las heces frescas detectadas en las parcelas fueron registrados en el campo, a través de una base de datos (SpintDB) para dispositivos móviles, anotando la parcela, fecha, hora, UTM, presencia de ganado, presencia de caza y tipo de hábitat (Fig. 40). Las muestras fecales fueron mantenidas a -20°C hasta su análisis en el laboratorio. Por su parte, las muestras fecales destinadas al análisis coprológico de parásitos, fueron almacenadas en un recipiente cerrado a 4°C hasta su análisis. La no congelación de estas muestras permitió la migración de las larvas de parásitos en el laboratorio (MAFF, 1986).

5.2.3. Extracción de glucocorticoides e inmunoensayo enzimático

Los metabolitos del cortisol se extrajeron en muestras fecales frescas de acuerdo con los métodos modificados de Shideler et al. (1993). Las muestras de heces congeladas se secaron en una estufa a 90°C. Posteriormente, 0,7 g de cada muestra seca se colocaron en un tubo de ensayo con 2,5 ml de tampón fosfato y 2,5 ml de metanol. Los tubos se agitaron durante 16 h en un agitador orbital. El sobrenadante se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 30 min, desechando el sedimento y conservando los extractos fecales con la hormona diana a -20°C hasta su cuantificación.

La cuantificación de los metabolitos del cortisol se realizó mediante un inmunoensayo enzimático estable (EIA; DRG Instruments GMBH, 211 Marbug, Alemania), previamente validado biológicamente (inyección de ACTH en animales cautivos) y en el laboratorio para la especie (Escribano-Ávila et al., 2013). En el laboratorio se realizó un test de paralelismo a partir de una muestra fecal previamente cuantificada a la cual se le aplicaron diluciones seriadas según varios factores de dilución (1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, y 1:1). La curva obtenida fue paralela a la de la concentración estándar conocida ($P > 0,05$). La recuperación de cortisol en los ensayos fue de $112 \pm 7,3\%$ ($n = 8$). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo (precisión) para tres muestras fueron de 7,08 y 10,89 ng/g excremento seco, respectivamente. En cada ensayo realizado en el laboratorio se incluyó uno de los estándares del kit (DRG), cuya concentración de cortisol era conocida. Cuando las concentraciones de metabolitos del cortisol se desviaron más de 10% del valor esperado, el ensayo fue rechazado y se volvieron a analizar las muestras.

5.2.4. Análisis coprológicos

El análisis de la carga parasitaria de las muestras fecales de corzo, estuvo basado en la detección de huevos u ooquistes de endoparásitos, realizándose a través de la técnica de flotación. En los recuentos se utilizaron cámaras de McMaster y los resultados fueron expresados como huevos/ g heces húmedas.

La técnica de flotación se llevó a cabo según el método modificado de McMaster (Anon, 1986). Esta técnica se basa en que algunas formaciones parasitarias, como los ooquistes de coccidios y los huevos de cestodos y nematodos gastrointestinales, flotan en soluciones de densidad superior a la del agua ($>1,2 \text{ g ml}^{-1}$). Los recuentos de huevos se determinaron en cada muestra de heces frescas homogenizando 1 g de muestra en 42 ml de agua. Posteriormente, la mezcla se filtró a través de un tamiz de 250 μm , y se repitió el proceso hasta obtener 10 ml de filtrado. Luego el filtrado se centrifugó a 1500-2000 r.p.m. durante 3 min y se diluyó el sedimento en una solución salina hasta alcanzar los 15 ml. El preparado obtenido fue analizado en una cámara McMaster. Dicha cámara posee dos áreas de 0.15 ml, con líneas guía para asistir en el conteo. La muestra permaneció durante 5 min en reposo para permitir que los huevos subieran a la superficie. Finalmente, el número de huevos dentro de cada cuadrícula de la cámara fue contabilizado usando un microscopio óptico binocular a 10x.

5.2.5. Análisis estadísticos

El test de Shapiro-Wilk y el test de Levene se usaron para determinar la distribución normal de los datos y la homogeneidad de la varianza respectivamente. Cuando los datos no se distribuyeron normalmente, la variable respuesta se transformó usando $\log_{10}(x+0,01)$. Se realizó un Modelo Lineal General (ANCOVA) para determinar si los niveles de metabolitos del cortisol fecal (variable respuesta) variaban en relación con los factores fijos tipo de hábitat (pinar/roble), presencia de ganado (si/no), presencia de caza (si/no), y con la covariable carga de parásitos broncopulmonares (huevos/g heces). Los datos se presentan como media \pm error estándar (SE). Los resultados se consideraron significativas a $\alpha < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 22.0.

5.3. Resultados

Los niveles medios de metabolitos del cortisol en las 120 muestras fecales frescas analizadas fueron $1214,8 \pm 50,9 \text{ ng/g}$ de excremento seco. El Modelo Lineal General reveló que los niveles de metabolitos del cortisol fecal estaban influenciados por el

tipo de hábitat y por la interacción entre el tipo de hábitat y la presencia de ganado (Tabla 13), siendo éstos significativamente mayores en los bosques de pino albar ($1331,5 \pm 76,6$ ng/g de heces secas, $n = 60$) en comparación con los bosques de roble melojo ($1098,1 \pm 64,2$ ng/g, $n = 60$) (Fig. 41A). En las zonas con presencia de ganado vacuno, los niveles de metabolitos del cortisol fecal fueron significativamente mayores en los pinares ($1364,0 \pm 82,0$ ng/g, $n = 30$) que en los robledales ($1.020,7 \pm 96,9$ ng/ g de heces secas, $n = 30$) (Fig. 41B). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de metabolitos del cortisol fecal entre los dos tipos de hábitat en las zonas sin ganado (Fig. 41B). La densidad de corzos, la caza y la abundancia de nematodos broncopulmonares no afectaron significativamente a los niveles de metabolitos del cortisol fecal (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados del Modelo Lineal General donde se muestran los factores fijos (tipo de hábitat y presencia de ganado) y las covariables (densidad de corzo y parásitos pulmonares excretados) que explican las variaciones en los niveles de metabolitos del cortisol fecal (variable respuesta).

Modelo lineal general para la variación en los niveles de metaolitos del cortisol fecal			
Variables	<i>F</i>	g.l.	<i>P</i>
Tipo de hábitat	5,087	1	0,02
Presencia de ganado	0,526	1	0,47
Presencia de caza	2,25	1	0,13
Log10 nemátodos broncopulmonares	0,359	1	0,55
Densidad de corzos	0,697	1	0,40
Presencia de ganado * Tipo de hábitat	4,148	1	0,04

Los niveles medios de metabolitos del cortisol fecal no resultaron significativamente diferentes en relación con la presencia de nematodos (broncopulmonares y gastrointestinales) (presencia: $1156,9 \pm 94,3$; ausencia: $1233,2 \pm 60,2$ ng/g) (ANOVA: $F = 0,34$, g.l.= 1, $p = 0,55$), ni en relación con la presencia de coccidios (presencia: $1203,19 \pm 117,0$ ng/g; ausencia: $1217,6 \pm 56,8$ ng/g) (ANOVA: $F = 0,07$, g.l.= 1, $p = 0,78$).

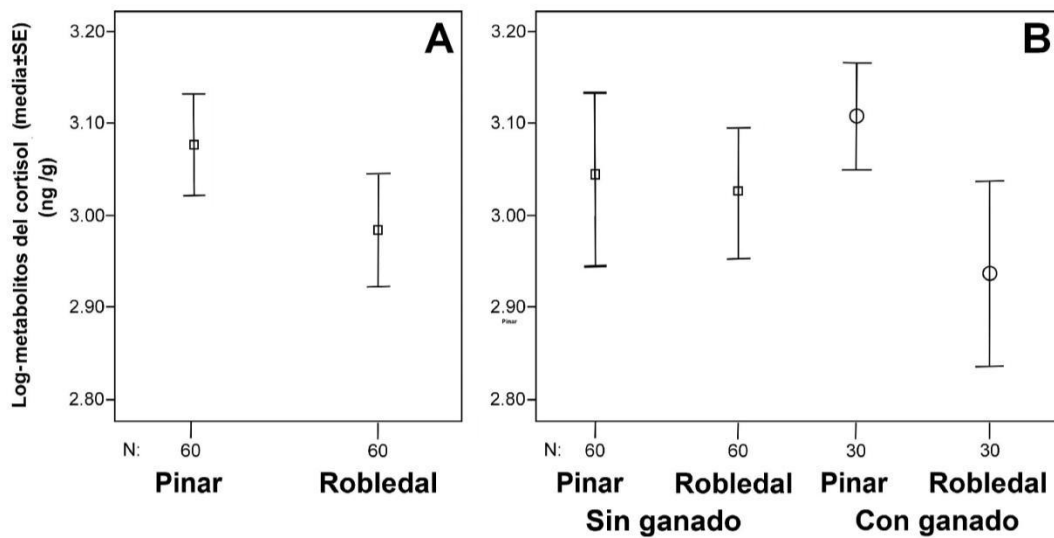


Figura 41. Niveles medios de metabolitos del cortisol fecal. (A) Diferencias encontradas en los dos tipos de hábitats muestreados. (B) Diferencias según la presencia o ausencia de ganado en cada tipo de hábitat.

La densidad de corzos observada (número de corzos/100 ha) osciló entre $3,13 \pm 0,51$ ($CV\% = 16,4$, $IC\ 95\% = 2,26$ a $4,34$) en las zonas de pinar con ganado y los $6,9 \pm 1,51$ ($CV\% = 18,9$, $IC\ 95\% = 4,77$ a $10,27$) en las zonas de robledal sin ganado.

5.4. Discusión

El enfoque fisiológico usado en el presente estudio permitió evaluar cómo influían en la respuesta de estrés fisiológico del corzo algunos factores ambientales y las intervenciones humanas sobre el medio. Los resultados indicaron que el tipo de hábitat y su interacción con la ganadería extensiva actúan como agentes estresantes en las poblaciones silvestres de corzo, aumentando los niveles de glucocorticoides fecales.

El efecto de la calidad del hábitat en la respuesta de estrés fisiológico se ha estudiado en diferentes especies silvestres de mamíferos (Foley et al., 2001; Homan et al., 2003). En las poblaciones de corzo analizadas, las concentraciones de metabolitos del cortisol fecal (FCM) fueron significativamente más altas en los bosques de pino albar que en los bosques de roble melojo, evidenciando la diferencia de calidad entre

estos dos hábitats y en consonancia con otros estudios sobre la especie (Escribano-Ávila et al., 2013). El corzo, aunque capaz de adaptarse a casi todos los tipos de bosques de coníferas y frondosas, prefiere un mosaico de bosques mixtos con espacios abiertos (Prior, 1968; Pedrolí et al., 1981), con una predilección de bosques con diferentes edades, con sotobosque abundante y diverso y con presencia de prados (Pielowski, 1970). En las zonas boscosas, muestran una fuerte preferencia por los espacios abiertos (Baleishis y Prusaite, 1980) especialmente en los bosques caducifolios, evitando los bosques de pino (Padaiga, 1984).

El predominio en la utilización de bosques de frondosas frente a bosques de coníferas parece guardar relación con una mayor calidad trófica de estas comunidades. El corzo se alimenta de plantas desde el nivel del suelo hasta aproximadamente 120 cm, aunque con preferencia por los niveles intermedio, en torno a los 75 cm (Duncan et al., 1998). Los bosques de roble parecen ser particularmente importantes en la dieta de corzo en el ámbito de estudio. Fandos et al. (1987) observaron en el análisis de la dieta del corzo en zonas boscosas que el principal recurso alimenticio consistía en plantas leñosas, destacando el roble y las especies arbustivas de *Rubus* sp., durante las cuatro estaciones del año. Otros autores (Maillard y Picard, 1987) también observaron que cuando los frutos son abundantes en otoño, como ocurre en los bosques de roble con las bellotas, los corzos son dependientes de este tipo de frutos. Sin embargo, los bosques de pino albar del ámbito de estudio, aunque formados por un buen dosel arbóreo, tienen una baja diversidad y un reducido estrato arbustivo, debido principalmente a los trabajos de gestión forestal relacionados con la prevención de incendios (Bailón et al., 2008). En un estudio realizado en Francia, donde se midió la calidad de las plantas, el contenido de celulosa o lignina jugó un papel importante, ya que las principales especies vegetales de la dieta en el corzo eran las menos fibrosas (Tixier et al., 1997). Al evaluar un biotopo de bosque por la calidad, el estrato arbustivo tiene gran importancia (Vincent et al., 1979) y los bosques de frondosas y bosques mixtos son preferidos siempre frente a los bosques de coníferas. Los bosques de frondosas ofrecen mejor calidad de hábitat para el corzo que los bosques de coníferas,

especialmente si éstos son monoespecíficos (Strandgaard, 1972; Aulak y Babinska-Werka, 1990), como ocurre en el ámbito de estudio.

Por otro lado, la ganadería extensiva no influyó de forma independiente en las variaciones en las concentraciones de FCM en la población de corzo estudiada. Existe una tendencia actual a valorar el papel de la ganadería extensiva en la mejora de la diversidad de los paisajes mediterráneos (Gabay et al., 2008). Los movimientos del ganado y el pastoreo crean vacíos dentro los ecosistemas de bosque más cerrado, beneficiando a especies ramoneadoras como el corzo. Sin embargo, en los bosques de pino, con baja diversidad arbustiva, el pastoreo puede reducir la capacidad de regeneración de especies palatables, creando lagunas en la vegetación leñosa y beneficiando las comunidades de plantas herbáceas (San Miguel, 2003), poco apetecibles para el corzo. En definitiva, aunque la propia ganadería extensiva no es un factor de estrés para el corzo, su impacto en un hábitat desfavorable como los bosques de pino, determinan directamente el aumento de la respuesta de estrés fisiológico en los ejemplares de estas zonas.

Aunque la carga de nematodos broncopulmonares fue mayor en las zonas con presencia de ganado, no se observó una relación entre los niveles de FCM y la carga parasitaria. Además, cuando se compararon muestras con presencia de parásitos broncopulmonares, gastrointestinales y coccidios con otras en las que no aparecían no se encontraron diferencias significativas en los niveles de FCM. Los parásitos regulan las poblaciones en algunos casos y diezman las especies en otros, sin embargo, bajo muchas condiciones ambientales simplemente existen en equilibrio, sin efectos perjudiciales para el hospedador (Feldhamer et al., 1999). En otros estudios, las interacciones entre parásito-niveles de glucocorticoides son a menudo bidireccionales: el aumento de los niveles de glucocorticoides pueden deprimir el sistema inmune, y a su vez, la infección parasitaria pueden aumentar los niveles de glucocorticoides, ya sea a través del estrés inducido por la infección o por medio de la inmunosupresión inducida por el estrés (Brown y Fuller, 2006). En nuestro estudio, los animales con mayores cargas de parásitos pulmonares, tenían niveles de metabolitos del cortisol

fecal similares a los animales no parasitados o a los que mostraban cargas parasitarias menores, lo que confirma la buena condición física de los corzos de la Sierra de Guadarrama, sirviendo como referencia de carga parasitaria en animales sanos para estos hábitats.

Al contrario de lo esperado, la caza, no influyó en la respuesta de estrés en las poblaciones de corzo de la Sierra de Guadarrama. Esta actividad en el área de estudio se realiza bajo modalidades tradicionales como el rececho, que son realizadas por un solo cazador de forma sigilosa, por lo que los corzos de estos cotos no perciben la caza como un estímulo adverso, ni están expuestos a esta interferencia, como podría ocurrir con otras modalidades más impactantes como las batidas o las monterías.

En conclusión, los presentes resultados indican que es posible detectar el efecto de los factores ambientales, incluidas las perturbaciones humanas, en especies silvestres como el corzo, proporcionando información de gran valor en la toma de decisiones que garanticen su conservación. El aumento en la respuesta de estrés del corzo en el área de estudio a factores como la ganadería extensiva y calidad del hábitat sugieren pautas de gestión en la mejora de la diversidad y calidad de los hábitats y en la gestión de la ganadería extensiva.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. En los muestreos a pie durante el atardecer se obtuvo un mejor ajuste en la función de detección, pero la mayoría de los corzos se movían después de que fueran detectados por el observador, por lo que es probable que algunos animales pudieran huir antes de ser vistos, lo que incumpliría la segunda premisa de este tipo de técnicas de muestreo a distancia (los animales se detectan en su ubicación inicial antes de cualquier movimiento en respuesta al observador). Los muestreos de distancia por la noche en coche y con la ayuda de focos favorecieron la detección de los corzos y no afectaron prácticamente a su comportamiento. No obstante, esta técnica implicó un desequilibrio en los contactos de los primeros metros, lo que afectó al tratamiento estadístico de las funciones de detección en la estima de la densidad.
2. La marcada estacionalidad de la Sierra de Guadarrama contribuyó a la eficacia en la determinación de la edad de los corzos a través de líneas de crecimiento dentario, mostrando secciones de dientes con líneas bien marcadas, ya que la incidencia de estas líneas de crecimiento se ve favorecida por las diferencias estacionales.
3. Aunque los corzos analizados en la Sierra de Guadarrama mostraron un rápido crecimiento individual, similar en ambos sexos, en consonancia con la descripción general de la especie, el dimorfismo sexual, a diferencia de otras poblaciones, estuvo basado en el peso corporal y el perímetro torácico, con machos corpulentos pero con una envergadura similar a la hembra.
4. El pelaje de los corzos del área de estudio, mostró una gran variedad de coloraciones en la muda de primavera, en relación con otras poblaciones descritas en España y Europa, con ejemplares grises, marrones, rojos y ocre. Por el contrario, en la muda de otoño sólo se observaron ejemplares grises

con pequeñas diferencias en la tonalidad. No se encontró ninguna relación entre las diferentes coloraciones y las dimensiones corporales y el peso.

5. El análisis del genoma mitocondrial indicó una tasa relativamente alta de variación con 5 haplotipos sin un origen común, estando relacionados con diferentes poblaciones de la Península Ibérica y Europa, por lo que no se puede afirmar la existencia de subespecies en la Península Ibérica.
6. El análisis del genoma nuclear a través de marcadores microsatélites, presentó pruebas de un empobrecimiento relativo de la población, como lo demuestra un déficit de heterocigosis apuntando a una cierta endogamia. La riqueza alélica fue en general más baja que en otras poblaciones europeas. Respeto a la estructura genética no pudo rechazarse la hipótesis de la existencia de una sola población.
7. Los dos marcadores utilizados, con diferente patrimonio y tasa de mutación desigual, reflejaron cada una de las dos etapas principales en la reciente evolución del corzo en la Sierra de Guadarrama: por un lado las etapas glaciales e interglaciares del Pleistoceno han aportado variabilidad, y por otro, la reducción y recuperación de las poblaciones a lo largo del siglo XX, reflejaron un empobrecimiento relativo del genoma nuclear.
8. La elevada presencia de ganado vacuno ha aumentado el riesgo de infecciones y fue determinante en la carga parasitaria de nematodos broncopulmonares, especialmente en el caso del género *Dictyocaulus*, más frecuente que en otras poblaciones españolas. Además, en consonancia con otros estudios, las densidades bajas de corzo no fueron un factor determinante en la abundancia de nematodos broncopulmonares.
9. El tipo de hábitat fue determinante en la carga parasitaria de nematodos broncopulmonares. Las muestras de heces recogidas en los bosques de pino mostraron mayor carga de nematodos que las recogidas en los bosques de roble, debido a que estos bosques poseen una menor diversidad arbustiva y

una mayor frecuencia de hospedadores intermediarios de algunos géneros como *Protostrongylus*.

10. La población de corzos estudiada tuvo poco contacto con la mayoría de los agentes virales analizados y *Brucella*, pero un contacto mayor con otras enfermedades infecciosas como PTBC (paratuberculosis). Por lo tanto, sugerimos que la prevalencia de anticuerpos contra PTBC en el corzo se pudo determinar en gran medida por factores ambientales, posiblemente debido a la supervivencia del patógeno en el medio ambiente y su movimiento en las poblaciones de rumiantes salvajes en la Sierra de Guadarrama, como se indica anteriormente para los ciervos en la Península Ibérica.
11. Los niveles de metabolitos del cortisol fecal en la población de corzo estudiada no variaron al azar. El tipo de hábitat y la interacción de éste con la presión ganadera fueron los factores responsables del aumento en la respuesta de estrés. A pesar de las diferencias existentes en la carga parasitaria de los corzos analizados con respecto a diferentes ambientes, las concentraciones de metabolitos del cortisol fecal fueron similares en los animales con diferentes niveles de parasitación, lo que contribuye a concluir que las poblaciones de corzos en el área de estudio tienen una buena condición física. Los resultados de este estudio, sin duda, serán de interés para la gestión de la especie en el medio natural y, en particular, en los espacios naturales protegidos como la Sierra de Guadarrama. Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos se sugiere a los gestores de espacios naturales, que traten de disminuir la presencia de factores estresantes en el medio como la presencia de ganadería extensiva en hábitats con recursos alimenticios limitados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abáigar, T.; Domene, M.A. & Palomares, F. (2010). Effects of fecal age and seasonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. *European Journal of Wildlife Research*, 56: 781-787.
- Acevedo, P.; Delibes-Mateos, M.; Escudero, M.A.; Vicente, J.; Marco, J. & Gortázar, C. (2005). Environmental constraints in the roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) colonization sequence across the Iberian Mountains (Spain). *Journal of Biogeography*, 32: 1671-1680.
- Aitken, R.J. (1975). Cementum layers and tooth wear as criteria for aging roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Zoology*, 175: 15-28.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Alfárez, F.; Molero, G.; Maldonado, E.; Bustos, V.; Brea, P. y Buitrago A.M. (1982). Descubrimiento del primer yacimiento cuaternario (Riss-Würm) de vertebrados con restos humanos en la provincia de Madrid (Pinilla del Valle). *COL-PA publicaciones del departamento de paleontología*, 37: 15-32.
- Álvarez, G. (1988). Problemas asociados a la aplicación del transecto lineal para el censo de las poblaciones de cérvidos en un biotopo mediterráneo (Quintos de Mora, Montes de Toledo). *Ecología*, 2: 233-249.
- Andersen, B.G. & Borns, H.W. (1994). *The ice age world*. Scandinavian University Press. Oslo.
- Andersen, R.; Gaillard, J.M.; Lieberg, O. & San José, C. (1998) Variation in life history parameters in roe deer. In: R. Andersen, P. Duncan & J.D.C. Linnell (eds.). *The european roe deer: the biology of success*, 285-307. Scandinavian University Press. Oslo.
- Anderson, D.R.; Burnham, K.P. Lubow, B. C.; Thomas, L.E.N.; Corn, P.S.; Medica, P.A. & Marlow, R.W. (2001). Field trials of line transect methods applied to estimation of desert tortoise abundance. *Journal of Wildlife Management*, 65: 583-597.
- Angibault, J.M.; Bideau, E.; Vincent, J.P. & Quéré, J.P. (1993). Détermination de l'âge chez le chevreuil (*Capreolus capreolus* L.). Test de critères morphologiques d'animaux d'âge connu. *Mammalia*, 574: 579-587 (in French, English summary).
- Anon (1986). *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. Her Majesty's Stationery Office, London.

- Aparicio, T. (2006). Catálogo bibliográfico de los gasterópodos terrestres de la Comunidad de Madrid. *Graellsia*, 62: 99-103.
- Aragón, S. (1993). El corzo (*Capreolus capreolus*) en Cádiz. Caracterización y encuadre de sus poblaciones en el conjunto de la especie. Ph.D. thesis, Universidad de Sevilla, España.
- Aragón, S.; Braza, F. & San José, C. (1995). Socioeconomic, physiognomic, and climatic factors determining the distribution pattern of roe deer *Capreolus capreolus* in Spain. *Acta Theriologica*, 40: 37-43.
- Aragón, S.; Braza, F.; San José, C. & Fandos, P. (1997). Variabilite craniometrique en fonction de l'age chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*). *Mammalia*, 61: 603-610 (in French).
- Arneberg, P.; Folstad, I. & Karter, A.J. (1996). Gastrointestinal nematodes depress food intake in naturally infected reindeer. *Parasitology*, 112: 213-219.
- Aulak, W. & Babinska-Werka, J. (1990). Preference of different habitats and age classes of forest by roe deer. *Acta Theriologica*, 35: 289-298.
- Axelrod, J. & Reisine, T.D. (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224: 452-459.
- Azorit, C.; Hervas, J.; Analla, M.; Carrasco, R. & Muñoz-Cobo, J. (2002). Histological thin-sections: a method for the microscopic study of teeth in Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 31: 224-227.
- Azorit, C.; Muñoz-Cobo, J.; Hervás, J. & Analla, M. (2004). Ageing through growth marks in teeth of Spanish red deer. *Wildlife Society Bulletin*, 32: 702-710.
- Baccus, R.; Ryman, N.; Smith, M.H.; Reuterwall, C. & Cameron, D. (1983) Genetic variability and differentiation of large grazing mammals. *Journal of Mammology*, 64: 109-120.
- Baermann, G. (1917). Eine einfache methode zur auffindung von ankylostomum (Nematoden) larven in erdproben. *Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië*, 57: 131-137.
- Bailón, L.J.; García, F.M. y Tenerio, M.C. (2008): Estudiocomparado de la diversidad florística en masas de origennatural y repoblado de *Pinus sylvestris* L. en la Sierra de Guadarrama (Sistema Central). *Forest Systems*, 15: 111-123.
- Baker, K.H. & Hoelzel, A.R. (2014). Influence of Holocene environmental change and anthropogenic impact on the diversity and distribution of roe deer. *Heredity*, 112(6), 607-615.

- Baleishis, R.M. & Prusaite, J.A. (1980). European roe feeding in a small deciduous forest of North Lithuania in 1975-1976. *Proceedings of the Lithuanian Academy of Sciences*, 1: 85-91.
- Bang, P. & Dahlstrom, P. (1999). Huellas y señales de los animales de Europa. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- Barasona, A. (2015). Epidemiología y prevención en la interacción sanitaria entre ungulados domésticos y silvestres. Ph.D. thesis, Instituto de investigación en recursos cinegéticos (IREC), Ciudad Real.
- Barea-Azcón, J.M.; Virgos, E.; Ballesteros-Duperon, E.; Monleón, M. & Chiroso, M. (2007). Surveying carnivores at large spatial scales: a comparison of four broad-applied methods. *Biodiversity and Conservation*, 16: 1213-1230.
- Barja, I. (2009). Prey and prey-age preference by Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in a multiple-prey ecosystem. *Wildlife Biology*, 15: 147-154.
- Barja, I.; Escribano-Ávila, G.; Lara-Romero, C.; Virgós, E.; Benito, J. & Rafart, E. (2012). Non-invasive monitoring of adrenocortical activity in European badgers (*Meles meles*) and effects of sample collection and storage on faecal cortisol metabolite concentrations. *Animal Biology*, 62:419-432.
- Barja, I.; Silván, G. & Illera, J.C. (2008). Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Journal of chemical ecology*, 34:697-701.
- Barja, I.; Silván, G.; Rosellini, S.; Piñeiro, A.; González-Gil, A.; Camacho, L. & Illera, J.C. (2007). Stress physiological responses to tourist pressure in a wild population of European pine marten. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 104: 136–142.
- Baviere De, A.J. (1983). *A propos du Chevreuil*. Ed. Gerfaut Club. Paris.
- Begon, M.; Harper, J.L. y Townsend, C.R. (1988). *Ecología: individuos, poblaciones y comunidades*. Omega, Barcelona.
- Bergmann, K.G.L.C. (1847). Über die Verhältnisse der wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. *Göttinger studien*, 3: 595–708 (in Germany).
- Bibby, C. J. & Buckland, S.T. (1987). Bias of bird census results due to detectability varying with habitat. *Acta Oecologica*, 8: 103-112.
- Bibby, C. J. (1999). Making the most of birds as environmental indicators. *Ostrich*, 70: 81-88.

- Bideau, E.; Gerard, J.F.; Vincent, J.P. & Maublanc, M.L. (1993). Effects of age and sex on space occupation by European roe deer. *Journal of Mammalogy*, 74: 745-751.
- Blanco, E. (2001). Viaje por la flora y vegetación de la Sierra de Guadarrama. Un recorrido geobotánico por la sierra. En: Fundación Canal Isabel II y FIDA (eds.). *Guadarrama. Sinfonía inacabada*, 45-51. Comunidad de Madrid.
- Blanco, J.C.; Espina, J.; Ruiz de Larramendi, A. y Delibes, J. (1983). Lista patrón comentada de los mamíferos de la provincia de Madrid. Informe inédito. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Diputación de Madrid.
- Blant, M. (1987). Dynamique de population, condition et constitution du chevreuil (*Capreolus capreolus*) dans les cantons de Neuchatel et Vaud (ouest de la Suisse). Ph.D. thesis, Univ. Nêuchatel, Suisse (in French, English summary).
- Blasco, J. M.; Garin-Bastuji, B.; Marin, C. M.; Gerbier, G.; Fanlo, J.; Jiménez de Bagués, M.P. & Cau, C. (1994). Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Veterinary Record*, 134: 415-420.
- Blottner, S.; Hingst, O. & Meyer, H.H.D. (1996). Seasonal spermatogenesis and testosteroneproduction in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Reproduction*, 108: 299-305.
- Boadella, M.; Carta, T.; Oleaga, A.; Pajares, G.; Muñoz, M. & Gortázar, C. (2010). Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Veterinary Research*, 6: 51.
- Boch, H. & Schneidawind, H. (1988). *Krankheiten des jagbaren Wildes*. Parey, Berlin.
- Boh, B.; Kosir, I.; Kukovic, M.; Skerlavaj, V. & Skvarc, A. (1998). Experimental microencapsulation and testing of the repellent daphne for prolonged protection of plants against roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Sodobno Kmetijstvo*, 31: 553-558.
- Bonier, F.; Martin, P.R.; Moore, I.T. & Wingfield, J.C. (2009). Do baseline glucocorticoids predict fitness? *Trends in Ecology & Evolution*, 24: 634-642.
- Boonstra, R. (2004). Coping with changing northern environments: the role of the stress axis in birds and mammals. *Integrative and Comparative Biology*. 44: 95-108.
- Boonstra, R. (2005) Equiped for life: the adaptative role of the stress axis in male mammals. *Journal of mammalogy*, 86: 236-247.
- Braza, F.; San José C.; Aragón, S. y Delibes, J.R. (1994). *El corzo andaluz*. Estación Biológica de

- Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), Sevilla.
- Braza, F.; San José, C. y López, M. (2004). *El corzo en los Alcornocales*. Mapa de calidad de hábitats. Consejería de Obras Públicas y Transporte, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Braza, F.; San José, C.; Aragón, S. y Delibes, J.R. (1994). *El corzo andaluz (Andalusian roe deer)*. Junta de Andalucía, Cádiz.
- Braza, F.; Varela, I.; San José, C. & Cases, V. (1989). Distribution actuelle du chevreuil (*Capreolus capreolus*) du daim (*Dama dama*) et du cerf (*Cervus elaphus*) en Espagne. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 54: 393-396.
- Brown, J.L.; Wasser, S.K.; Wildt, D.E. & Graham, L.H. (1994). Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction*, 51: 776–786.
- Brown, J.L.; Wildt, D.E.; Wielebnowski, N.; Goodrowe, K.L.; Graham, L.H.; Wells, S. & Howard, J.G. (1996). Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *Journal of reproduction and fertility*, 106: 337–346.
- Brown, T.T. & Fuller, C.A. (2006). Stress and parasitism of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in dry and floodplain environments. *Canadian Journal of Zoology*: 84: 1833–1839.
- Buckland, S.T.; Anderson, D.R.; Burnham K. P. & Laake, J.L. (1993). *Distance sampling: estimating abundance of biological populations*. Chapman and Hall, London.
- Buckland, S.T.; Anderson, D.R.; Burnham, K.P.; Laake, J.L.; Borchers, D.L. & Thomas, L. (2001). *Introduction to distance sampling: estimating abundance of biological populations*. Oxford University Press, Oxford.
- Buckland, S.T.; Anderson, D.R.; Burnham, K.P.; Laake, J.L.; Borchers, D.L. & Thomas, L. (2004). *Advanced distance sampling: estimating abundance of biological populations*. Oxford University Press, Oxford.
- Buitrago, A.M. (1992). *Estudio de los Artiodáctilos del yacimiento del Pleistoceno medio de Pinilla del Valle (Madrid)*. Ph.D. thesis, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Burnham, K.P. Anderson, D.R. & Laake, J.L. (1980). Estimation of density from line transect sampling of biological populations. *Wildlife monographs*, 72: 1-202.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R. (1984). The need for distance data in the transect counts.

Journal of Wildlife Management, 48: 1248-1254.

- Busch, S.; Robinson, W.D.; Robinson, T.R. & Wingfield, J.C. (2011). Influence of proximity to a geographical range limit on the physiology of a tropical bird. *Journal of Animal Ecology*, 80: 640-649.
- Caballero, A. & Toro, M.A. (2002). Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 3: 289-299.
- Cabrera, A. (1914). *Fauna Ibérica: Mamíferos*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid.
- Cabrera, A. (1916). Un nuevo cérvido español. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 16: 175-176.
- Carranza, J. (1996). Sexual selection for male body mass and the evolution of litter size in mammals. *American Naturalist*, 148: 81-100.
- Carroll, R.L. (1998). *Vertebrate paleontology and evolution*. Freeman & Co.; New York.
- Cederlund, G. (1981). Daily and seasonal activity pattern of roe deer in a boreal habitat. *Swedish Wildlife Research*, 1: 315-353.
- Cederlund, G. (1989). Activity patterns in moose and roe deer in a north boreal forest. *Holar. Ecology*, 12: 39-45.
- Cederlund, G.; Bergqvist, J.; Kjellander, P.; Gill, R.; Gaillard, J. M.; Boisaubert, B.; Ballon, P. & Duncan, P. (1998). Managing roe deer and their impact on the environment: Maximising the net benefits to society. In: Andersen, R.; Duncan, P. & Linnell, J. D. C. (ed.). *The European roe deer: the biology of success*, 337-372. Scandinavian University Press, Oslo.
- Centenera, R. (2005). *El corzo. Acercamiento a una realidad. Expansión, caza y gestión*. La Trevere. Madrid.
- Chapman, N.G.; Claydon, K.; Claydon, M.; Forde, P.G. & Harris, S. (1993). Sympatric populations of muntjac (*Muntiacus reevesi*) and roe deer (*Capreolus capreolus*): a comparative analysis of their ranging behaviour, social organization and activity. *Journal of Zoology*, 229: 623-640.
- Chroust, K. (1989) Epizootiology and prevention of helminthiasis of game animals in Czechoslovakia and its relationship to the parasitic diseases of cattle. *Angewandte Parasitologie*, 30: 11-4.

- CIAM (2005). *Sistema de documentación para la planificación territorial*. Centro de investigaciones ambientales Fernando González Bernáldez. Comunidad de Madrid.
- Cisek, A.; Balicka-Ramisz, A.; Ramisz, A. & Pilarczyk, B. (2003). Course and treatment of lungworm infection game animals (red deer, roe deer and fallow deer) in North-West Poland. *Electronical Journal of Polish Agricultural Universities. Veterinary Medicine*, 6: 1-7.
- Clement, M.; Posada, D. & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1660.
- Comunidad de Madrid (2003). *Plan de ordenación de los recursos naturales del Parque Natural de la Cumbre, Circo y Lagunas de Peñalara*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid.
- Conde de Yebes (1943). *Veinte años de caza mayor*. Espasa-Calpe, S.A. Madrid.
- Conraths, F.J.; Gethmann, J.M.; Staubach, C.; Mettenleiter, T.C.; Beer, M. & Hoffmann, B. (2009). Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 433.
- Costa, L. (1992). *Ecología del corzo en las montañas cantábricas. Modelo de gestión*. Ph.D. thesis, Universidad de León, Spain.
- Costa, L. (1995). First data on the size of north-Iberian roe bucks (*Capreolus capreolus*). *Mammalia*, 59: 447-451.
- Costa, M.; Morla, C. y Sainz-Ollero, H. (1992). *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*. Editorial geoplaneta. Barcelona.
- Coulon, A.; Cosson, J.F.; Angibault, J.M.; Cargnelutti, B.; Galan, M.; Morellet, N.; Petit, E.; Aulagnier, S. & Hewison, A.J. (2004). Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13: 2841-2850.
- Creel, S.; Fox, J.E.; Hardy, A.; Sands, J.; Garrott, B. & Peterson, R.O. (2002). Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk. *Conservation Biology*, 16: 809-814.
- Cronin, M.A. (1991) Mitochondrial-DNA phylogeny of roe deer (*Cervidae*). *Journal of Mammalogy*, 72: 533-566.
- Czyżowski, P.; Karpiński, M.; Drozd, L. & Tajchman, K. (2009). Individual condition evaluation of

- female European roe deer by biometric measurement. *Chest*, 14: 0-27.
- Danilkin, A. & Hewison, A.J.M. (1996). *Behavioural ecology of Siberian and European roe deer*. Chapman and May, London.
- Dehnhard, M.; Clauss, M.; Lechner-Doll, M.; Meyer, H.H.D. & Palme R. (2001). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by Measurement of Fecal Cortisol Metabolites. *General and Comparative Endocrinology*, 123: 111–120.
- Deinhofer, M.; Rossmanith, W.; Kuhne, S.; Deinhofer, R.; Janacek, R.; Kienesberger, J. & Wilhelm, E. (2004). Successful control of BVD-infection on common grassland. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 91: 72-76.
- Delgado, F.A.; Brea, P.; Buitrago, A. M.; Maldonado, E.; y Molero, G. (1982). Descubrimiento del primer yacimiento cuaternario (Riss-Würm) de vertebrados con restos humanos en la provincia de Madrid (Pinilla del Valle). *Coloquios de Paleontología*, 37, 15.
- Delibes, J.R. (1996). *Ecología y comportamiento del corzo (Capreolus capreolus L. 1758) en la Sierra de Grazalema (Cádiz)*. Ph.D. thesis, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Dempster, J.P. (1975). *Animal population ecology*. Academic Press. London.
- Diefenbach, D.R.; Brauning, D. W. & Mattice, J.A. (2003). Variability in grassland bird counts related to observer differences and species detection rates. *Auk*, 120: 1168-1179.
- Diéguez, F.J.; Arnaiz, I.; Sanjuán, M.L.; Vilar, M.J.; López, M. & Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Preventative Veterinary Medicine*, 82: 321-326.
- Díez-Baños, P.; Morrondo-Pelayo, P. y Díez-Baños, N. (1999). Parasitosis respiratorias. En: Cordero del Campillo M. y Rojo Vázquez F.A. (eds). *Parasitología Veterinaria*, 374-400. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Díez-Guerrier, A. (1999). La ganadería en Rascafria: situación actual y futuro. In: Comunidad de Madrid (ed.). *Primeras jornadas científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular*, 81-83. Comunidad de Madrid.
- Dingeldein, W. (1982). Beitrag zur Ermittlung des Gesundheitsstatus einer Reh wild population eines Versuchsreviers im Zeitraum 1976-1981. *Tierärztliche Umschau*, 37: 212-220.
- Divina, B.P.; Wilhemsson, E.; Mörner, T.; Mattsson, J.G. & Höglund, J. (2002). Molecular

- identification and prevalence of *Dictyocaulus* spp. (Trichostrongylidae: dictyocaulidae) in Swedish semi-domestic and free living cervids. *Journal of Wildlife Disease*, 38: 769-775.
- Do, H.H. & Rahm, E. (2004). Flexible integration of molecular-biological annotation data: The genmapper approach. In: Berlino E.; Christodoulakis S.; Plexousakis D.; Christophides V.; Koubarakis M, Böhm K.; Ferrari E. (eds). *Advances in database technology-EDBT 2004*, 811-822. Springer Berlin Heidelberg. Berlin.
- Dollinger, P. (1981). Parasitenbefall, Sterblichkeit und Todesursachen bei Rehen. *Verh. ber Erkrk Zootiere*, 23: 161-173.
- Douzery, E. & Randi E. (1997). The mitochondrial control region of *Cervidae*: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1154–1166.
- Duncan, P.; Tixier, H.; Hofmann, R.R. & Lechner-Doll, M. (1998). Feeding strategies and the physiology of digestion in roe deer. In: R. Andersen, P. Duncan & J.D.C. Linnell (eds.). *The european roe deer: the biology of success*: 91-116. Scandinavian University Press. Oslo.
- Durette-Desset, M.C.; Hugonnet, L. & Ghabaud, A.G. (1988). Redescription de *Dictyocaulus noerteri* (Railliet et Henry, 1907), parasite de *Capreolus capreolus* en Europe. Comparation avec *D. viviparus* (Bloch, 1782), parasite du bétail. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63: 285–295.
- Dzieciolowski, R. (1976). Estimating ungulate numbers in a forest by track counts. *Acta Theriologica*, 21: 217-222.
- Ellenberg, H. (1978). The population ecology of roe deer (*Capreolus capreolus* L. Cervidae) in central Europe. *Spixiana*, 2: 5-211.
- Escribano-Avila, G.; Pettorelli, N.; Virgós, E.; Lara-Romero, C.; Lozano, J.; Barja, I. & Puerta, M. (2013). Testing Cort-Fitness and Cort-Adaptation hypotheses in a habitat suitability gradient for roe deer. *Acta Oecologica*, 53: 38-48.
- Essen, L. (1966). Das Rehwild in Schweden Beitr. *Jagd-und Wildforsch*, 5: 143-148 (in German).
- Eve, J.H. & Kellogg, F.E. (1977). Management implications of abomasal parasites in southeastern white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*, 41: 169-177.
- Fandos, P. & Reig, S. (1993). Craniometric variability in two populations of roe deer (*Capreolus capreolus*) from Spain. *Journal of Zoology*, 231: 39-49.

- Fandos, P. (1991). *La cabra montés (Capra pyrenaica) en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y las Villas*. Serie Técnica ICONA, Madrid.
- Fandos, P. (1994). Skull biometry of Spanish roe deer (*Capreolus Capreolus*). *Folia Zoologica*, 43: 11-20.
- Fandos, P. y Horcajada, F. (1998). Biología y Singularidades del Corzo. *Revista Trofeo*, 337:18-23.
- Fandos, P.; Martínez T. y Palacios F. (1987). Estudio sobre la alimentación del corzo (*Capreolus capreolus*). *Ecología*, 1: 161-186.
- Feldhamer, G.A.; Drickamer, L.C.; Vessey, S.H. & Merritt, J.F. (1999). *Mammalogy: adaptation, diversity, ecology*. McGraw-Hill, New York.
- Fernández-González, F. (1988). Estudio florístico y fitosociológico del valle del Paular (Madrid). Ph.D. thesis, Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- FIDA (2008). *Ecología y caracterización genética de las poblaciones de corzo en la Comunidad de Madrid*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid.
- Flerov, K.K. (1952). *Fauna of USSR. Mammals. Vol. 1, No. 2. Musk deer and deer*. Academy of Sciences of the USSR, Moscow (in Russian; English translation 1960, Publisher for the National Science Foundation and Smithsonian Institution, Washington D.C.).
- Focardi, S.; Isotti, R.; Pelliccioni, E.R. & Iannuzzo, D. (2002). The use of distance sampling and mark-resight to estimate the local density of wildlife populations. *Environmetrics*, 13: 177-186.
- Focardi, S.; Montanaro, P.; Isotti, R.; Ronchi, F.; Scacco, M. & Calmanti, R. (2005). Distance sampling effectively monitored a declining population of Italian roe deer *Capreolus capreolus italicus*. *Oryx*, 39: 421-428.
- Foley, C.A.H.; Papageorges, S. & Wasser, S.K. (2001). Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in freeranging African elephants. *Conservation Biology*, 15: 1134–1142.
- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29:305-327.
- Franklin, I.R. (1980). Evolutionary change in small populations. In: M. E. Soulé and B. A. Wilcox (eds). *Conservation biology: an evolutionary perspective*, 135-149. Sinauer associates,

Sunderland, Massachusetts.

- Fruzinski, B.; Kaluzinski, J. & Baksalary, J. (1982). Weight and body measurements of forest and field roe deer. *Acta Theriologica*, 27: 479-488.
- Fruzinski, B.; Labudzki, L. & Wlazelko, M. (1983). *Habitat, density and spatial structure of the forest roe deer population*. *Acta theriologica*, 28:243-258.
- Fuller, T.K. (1990). Dynamics of a Declining White-Tailed Deer Population in North-Central Minnesota. *Wildlife Monographs*, 110: 3-37.
- Gabay, O.; Perevolotsky, A. & Shachack, M. (2008). Landscape mosaics for enhancing biodiversity. On what scale and how to maintain it? In: *Options Méditerranéennes*, Series A, 79: 45-49.
- Gaffuri, A.; Giacometti, M.; Tranquillo, V.M.; Magnino, S.; Cordioli, P. & Lanfranchi, P. (2006). Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps. *Journal of Wildlife Diseases*, 42: 685-690.
- Gaillard, J.M.; Delorme, D.; Boutin J.M.; Van Laere, G.; Boisaubert, B. & Pradel, R. (1993). Roe deer survival patterns: a comparative analysis of contrasting populations. *Journal of Animal Ecology*, 62: 778-791.
- Galán, M.; Cosson, J.F.; Aulagnier, S.; Maillard, J.C.; Thévenon, S. & Hewison, A.J.M. (2003). Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3: 142-146.
- Gamarra, J.A.; Cabezón, O.; Pabón, M.; Arnal, M.C.; Luco, D.F.; Dubey, J.P.; Gortázar, C. & Almería, S. (2008). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in roe deer from Spain. *Veterinary parasitology*, 153:152-156.
- García-González, R. (1980). Estudio del crecimiento postnatal en corderos de raza rasa aragonesa, ecotipo ansotano. Ph.D. thesis, Universidad de Barcelona.
- Gazzola, A.; Bertelli, I.; Avanzinelli, E.; Tolosano, A.; Bertotto, P. & Apollonio, M. (2005). Predation by wolves (*Canis lupus*) on wild and domestic ungulates of the western Alps, Italy. *Journal of Zoology*, 266: 205-213.
- Georgiadis, N. (1985). Growth patterns, sexual dimorphism and reproduction in African ruminants. *African Journal of Ecology*, 23: 75-87.
- Gill, R. (1990). *Monitoring the status of European and North American cervids*. GEMS

Information Series 8, UNEP, Nairobi.

- Gill, R.M.A.; Johnson, A. L.; Francis, A.; Hiscocks, K. & Peace, A. J. (1996). Changes in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) population density in response to forest habitat succession. *Forest Ecology and Management*, 88: 31-41.
- Gill, R.M.A.; Thomas, M. L. & Stocker, D. (1997). The use of portable thermal imaging for estimating deer population density in forest habitats. *Journal of Applied Ecology*, 34: 1273-1286.
- Gliozzi, E, Abbazzi, L, Argenti, P, Azzaroli, A, Caloi, L, Capasso-Barbato, L. & Torre, D (1997). Biochronology of selected mammals, molluscs and ostracods from the middle pliocene to the late pleistocene in Italy. The state of the art. *Rivista italiana di paleontologia e stratigrafia*, 103: 369-388.
- Gobush, K.S.; Mutayoba, B.M. & Wasser, S.K. (2008). Long-term impacts of poaching on unrelatedness, stress physiology, and reproductive output of adult female African Elephants. *Conservation Biology*, 22: 1590-1599.
- Gortázar, C.; Acevedo, P.; Ruiz-Fons, F. & Vicente, J. (2006). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, 52:81-87.
- Gortázar, C.; Delahay, R.J.; McDonald, R.A.; Boadella, M.; Wilson, G.J.; Gavier-Wliden, D. & Acevedo, P. (2012). The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review*, 42: 193-206.
- Gortázar, C.; Ferroglio, E.; Hofle, U.; Frolich, K. & Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53: 241-256.
- Gortázar, C.; Herrero, J.; Villafuerte, R. & Marco, J. (2000). Historical examination of the status of large mammals in Aragón, Spain. *Mammalia*, 64: 411-422.
- Goss, R. J. (1983). *Deer antlers: regeneration, function and evolution*. Academic Press. New York.
- Goymann, W.; East, M.L.; Wachter, B.; Höner, O.P.; Möstl, E.; Van't Hof, T.J. & Hofer, H. (2001) Social, state-dependent and environmental modulation of faecal corticosteroid levels in free-ranging female spotted hyenas. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268: 2453-2459.
- Graham, L.H. & Brown, J.L. (1996) Cortisol metabolism in the domestic cat and implications

- for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. *Zoo Biology*, 15: 71-82.
- Gray, J. (1821). On the natural arrangement of vertebrate animals. *London Medical Repository*, 15: 296-320.
- Gregory, R.D.; Wilkinson, N.I.; Noble, D.G.; Brown, A.F.; Robinson, J.A.; Hughes, J. Procter, D.A.; Gibbons, D.W. & Galbraith, C.A. (2002). The population status of birds in the United Kingdom, Channel Islands and Isle of Man: an analysis of conservation concern 2002–2007. *British Birds*, 95: 410-448.
- Groves, C.P. & Grubb, P. (1987) Relationships of living deer. In: C.M. Wemmer (eds.). *Biology and Management of the Cervidae*, 21-59. Smithsonian Institution Press. Washington and London.
- Grubb, P. (1993). Orden Artiodactyla. In: D.E. Wilson & D.M. Reeder (eds.). *Mammal Species of the World*, 2a. Ed., 377-414. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Grue, H. & Jensen, B. (1979). Review of the formation of incremental lines in tooth cementum of terrestrial mammals. *Danish Review of Game Biology*, 11: 1-48.
- Guillet, C.; Bergström, R. & Cederlund, G. (1996). Size of winter home range of roe deer *Capreolus capreolus* in two forest areas with artificial feeding in Sweden. *Wildlife Biology*, 2: 107-111.
- Guillot, G.; Mortier, F. & Estoup, A. (2005). Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 708-711.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematics Biology*, 52: 696–704.
- Gutiérrez, A. (2000). Estado sanitario de los rumiantes silvestres de las reservas Nacionales de León. Ph.D. thesis, Facultad de Veterinaria. Universidad de León, España.
- Gutiérrez, J.P.; Royo, L.J.; Álvarez, I. & Goyache, F. (2005). MolKin v2.0: A computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718-721.
- Hanus, V. & Fiser, Z. (1981). Telesný vývoj srnčí zveri. *Práce vyzk. Ústavu Lesn.*, 58: 191-212.
- Harper, J. M. & Austad, S.N. (2000). Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73:

12–22.

- Harrington, R. (1985) Evolution and distribution of the Cervidae. *The Royal Society of New Zealand Bulletin*, 22: 3-11.
- Harris, S. (1978). Age determination in the red fox (*Vulpes vulpes*): an evaluation of technique efficiency as applied to a sample of suburban foxes. *Journal of Zoology*, 184: 91-118.
- Hartl, G.B.; Hewison, A.J.M.; Apollonio, M.; Kurt, F. & Wiehler, J. (1998). Genetics of European roe deer. In: Andersen R, Duncan P, Linnell J.D.C. (eds). *The European roe deer: the biology of success*, 71-90. Scandinavian University Press, Oslo.
- Hewison, A.J.M. (1993). The reproductive performance of roe deer in relation to environmental and genetic factors. Ph.D. thesis, University of Southampton, Southampton.
- Hewison, A.J.M.; Vincent, J.P.; Joachim, J.; Angibault, J.M.; Cargnelutti, B. & Cibien, C. (2001). The effects of woodland fragmentation and human activity on roe deer distribution in agricultural landscapes. *Canadian Journal of Zoology*, 79:679–689.
- Hewitt, G.M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87–112.
- Heydon, M. J.; Reynolds, J. C. & Short, M. J. (2000). Variation in abundance of foxes, *Vulpes vulpes*, between three regions of rural Britain, in relation to landscape and other variables. *Journal of Zoology*, 251: 253-264.
- Höglund, J.; Wilhelmsson, E.; Christensson, D.; Morner, T.; Waller, P. & Marrsson, J.C. (1999). ITS2 sequences of *Dictyocaulus* species from cattle, roe deer and moose in Sweden: molecular evidence for a new species. *International journal for parasitology*. 29: 607–611.
- Holand, Ø.; Myrsetrud, A.; Wannag, A. & Linnell, J.D.C. (1998). Roe deer in northern environments: physiology and behaviour. In: Andersen R, Duncan P, Linnell J.D.C. (eds). *The European roe deer: the biology of success*, 117-138. Scandinavian University Press, Oslo.
- Holland, O. (1992). Seasonal variation in body composition of European roe deer – *Canadian Journal of Zoology*, 70: 502-504.
- Homan, R.N.; Regosin, J.V.; Daniel M. Rodrigues, D.M.; Reed, J.M.; Windmiller, B.S. & Michael Romero L.M. (2003). Impacts of varying habitat quality on the physiological stress of

- spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Animal Conservation*, 6: 11–18.
- Horcajada, F y Fandos, P. (1999). La expansión del corzo. *Revista Trofeo*, 349:36-37.
- Horcajada, F. (2005). Radiografía de la población de corzo en el Parque Natural de Peñalara: Siete años de seguimiento en la montaña más emblemática de la Comunidad de Madrid. *Quercus*, 235: 12-18.
- Horcajada, F. (2007). Seguimiento de las poblaciones de corzo en el Parque Natural de Peñalara y Valle de El Páular. In: Comunidad de Madrid (ed.). *Quintas jornadas científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular*, 67-81. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid.
- Horcajada-Sánchez, F. & Barja, I. (2015). Evaluating the effectiveness of two distance-sampling techniques for monitoring roe deer (*Capreolus capreolus*) densities. *Annales Zoologici Fennici*, 52: 167-176.
- Hoskin, S.O.; Wilson, P.R.; Barry, T.N.; Charleston, W.A.G. & Waghorn, G.C. (2000). Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Research in Veterinary Science*, 68:223–230.
- Hosmer, D. W. & Lemeshow, S. (1989). *Applied Logistic Regression*. John Wiley y Sons, New York.
- Hoste, H.; Torres-Acosta J.F.J. & Aguilar-Caballero A.J. (2008). Nutrition parasite interactions in goats: is immune regulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunology*, 30:79–88.
- Huber, S, Palme, R. & Arnold, W (2003) Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology*. 130: 48–54.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Hufthammer, A.K. & Aaris-Sørensen, K. (1998). Late-and postglacial European roe deer. In: Andersen R, Duncan P, Linnell J.D.C. (eds). *The European roe deer: the biology of success*, 47-69. Scandinavian University Press, Oslo.
- Hugonnet, L. & Cabaret, J. (1987). Infection of roe deer in France by the lung nematode, *Dictyocaulus eckerti* Skrjabin, 1931 (*Trichostrongyloidea*): influence of environmental

- factors and host density. *Journal of Wildlife Diseases*, 23: 109–112.
- Jäger, F.; Hecht, W. & Herzog, A. (1992). Untersuchungen an mitochondrialer DNS (mtDNS) von hessischem Rehwild (*C. capreolus*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 38: 26–33.
- Jeandel, F. (1969). Contribution à l'étude des infestations parasitaires des cervides. Ph.D. thesis, Alfort. Université de Paris, Paris.
- Jeppensen, J.L. (1989). Activity patterns of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) at Kalø. *Danish Review of Game Biology*, 13: 1-32.
- Joly, D.O. & Messier, F. (2005). The effect of bovine tuberculosis and brucellosis on reproduction and survival of wood bison in Wood Buffalo National Park. *Journal of Animal Ecology*, 74:543–551.
- Kahlke, H.D. (1956) *Die Cervidenreste aus den altpleistozanen Ilmkiesen von Sussenborn bei Weimar*. Teil 1. Akademie Verlag, Berlin.
- Kahlke, H.D. (1958a) *Die Cervidenreste aus den altpleistozanen Tonen von Voigtstedt bei Sangerhausen*. Teil I. Die Schädel, Geweihe und Gehörne. Abh. Dtsh. Akad. Wiss. Berlin. Kl. Chemie, Geol. Biol. Jahrg. Berlin.
- Kahlke, H.D. (1958b) *Die Cervidenreste aus den Altpleistozanen sanden von Mosbach (Biebrich-Wiesbaden)*. Teil I. Abh. Dtsh. Akad. Wiss. Berlin. Kl. Chemie, Geol. Biol. Jahrg. Berlin.
- Kahlke, H.D. (1969) Die Rhinocerotiden-Reste aus den Kiesen von Sussenborn bei Weimar. Das Pleistozan von Sussenborn. *Pal. Abh. Paläozoologie*, 3: 667-709.
- Kaluzinski, J. (1974). The occurrence and distribution of field ecotype of roe deer in Poland. *Acta Theriologica*, 19:291-300.
- Kazlauskas, J. & Puzauskas, H. (1974). On the factors affecting the distribution of roe-deer helminths in Lithuania. *Acta Parasitologica Lituanica*, 12: 87-91.
- Kirkpatrick, R.L. (1980). Physiological indices in wildlife management. In: S.D. Schemnitz (eds.). *Wildlife management techniques manual*, 99-112. Wildlife Society, Washington.
- Klevegal, G.A. (1996). *Recording structures of mammals: determination of age and reconstruction of life history*. CRS Press, Balkema, Rotterdam.
- Korotkevich, Ye. L. (1970). *Late Neogenic Deer Steppes Lying to the north of the Black Sea*. Kiev: Naukova Dumka Publishers, Kiev.

- Korotkevich, Ye.L. (1974) A new member of the genus *Procapreolus* of steppes lying to the north of the Black Sea. *Vestnik Zoologii*, 6: 68-77.
- Kozakiewicz, B.; Kowalski, J.; Maszewska, I. & Prygodzki, H. (1986). Ekstensywnosc inwazji i próby zwalczania *Capreocaulus capreoli* (Stroh i Schmid, 1938) u sarnopólnych w Wielkopolsce (Infestation extensiveness and attempts of elimination of *Capreocaulus capreoli* in field roe deer in Great Poland). *Medycyna Weterynaryjna*, 42: 478-480.
- Krametter, R.; Nielsen, S.S.; Loitsch, A.; Froetscher, W.; Benetka, V.; Moestl, K. & Baumgartner, W. (2004). Pestivirus exposure in free-living and captive deer in Austria. *Journal of Wildlife Diseases*, 40: 791-795.
- Krebs, C.J. (1995). Two paradigms of population regulation. *Wildlife Research*, 22: 1-10.
- Kulak, G. & Wajdzik, M.; (2009). Klasyfikacja ekotypowa samców sarny europejskiej (*Capreolus capreolus* L.) na podstawie wybranych pomiarów ich ciała. *Sylwan*, 153: 563–574.
- Kutzer, E. & Prosl, H. (1975). Zur Kenntnis von *Elaphostrongylus cervi* Cameron 1931. 1. Morphologie und diagnose. *Wien Tierärztl Monatsschr*, 62: 258–266.
- Laboratorio Central Veterinario Weybridge (1973). *Manual de técnicas de parasitología veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Lehmann, E. (1971). Das Sommerkleid des Rehe im Klimagefalle. *Umschau*, 12: 428-429 (in German).
- Lillehaug, A.; Vikoren, T, Larsen, I.L.; Akerstedt, J.; Tharaldsen, J. & Handeland, K. (2003). Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *Journal of Wildlife Diseases*, 39: 779-786.
- Linden, A.; Gregoire, F.; Nahayo, A.; Hanrez, D.; Mousset, B.; Massart, A.; De Leeuw, I.; Vandemeulebroucke, E.; Vandenbussche, F. & de Clercq, K. (2010). Bluetongue virus in wild deer, Belgium, 2005-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 833-836.
- Linnell, J.D.C. & Andersen, R. (1998). Timing and synchrony of birth in a hider species, the roe deer *Capreolus capreolus*. *Journal of Zoology*, 244: 497-504.
- Lister, A.M.; Grubb, P. & Sumner, S.R.M. (1998). Taxonomy, morphology and evolution of European roe deer. In: Andersen R, Duncan P, Linnell J.D.C (eds). *The European roe deer: the biology of success*, 23-46. Scandinavian university press, Oslo.
- Liu, Z.; Wang, X.; Teng, L.; Cui, D. & Li, X. (2008). Estimating seasonal density of blue sheep

- (*Pseudois naysaur*) in the Helan Mountain region using distance sampling methods. *Ecological research*, 23:393-400.
- Lochmiller, R.L. & Deerenberg, C. (2000) Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88: 87-98.
- Loison, A.; Gaillard, J.M.; Pélabon, C. & Yoccoz, N.G.(1999). What factors shape sexual size dimorphism in ungulates? *Evolutionary Ecology Research*, 1: 611-633.
- López-Lillo, A. (1992). La situación actual de la Sierra de Guadarrama. En: Sáenz de Miera, A., Comunidad de Madrid (eds.). *La Sierra de Guadarrama. Naturaleza, paisaje y aire de Madrid*, XX-XX. Comunidad de Madrid, Madrid.
- Lorenzini, R. & Lovari, S. (2006). Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: the refuge area theory revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 88: 85-100.
- Lorenzini, R.; San José, C.; Braza, F. & Aragón, S. (2003). Genetic differentiation and phylogeography of roe deer in Spain, as suggested by mitochondrial DNA and microsatellite analysis. *Italian Journal of Zoology*, 70: 89–99.
- Loudon, A.S.I. (1987). The influence of forest habitat structure on growth, body size and reproduction in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). In: C.M. Wemmer (eds.). *Biology and management of the Cervidae*, 559-567. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Lutz, W. & Kierdorf, H. (1997). Parasite loads on roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from neighbouring habitats with different intensities of recreational traffic. *Zeitschrift fuer Jagdwissenschaft*, 43: 251-258.
- Luzón, M.; Santiago-Moreno, J.; Meana, A.; Toledano-Díaz, A.; Pulido-Pastor, A.; Gómez-Brunet, A. & López-Sebastián, A. (2008). Parasitism and horn quality in male Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) from Andalucía based on coprological analysis and muscle biopsy. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 353-361.
- Machackova, M.; Svastova, P.; Lamka, J.; Parmova, I.; Liska, V.; Smolik, J.; Fischer, O.A. & Pavlik, I. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Veterinary Microbiology*, 101: 225-234.
- Madoz, P. (1845). “*Diccionario geográfico-estadístico-histórico de España y sus posesiones de Ultramar*”. Madrid.
- MAFF (1986). *Ministry of agricultura, fisheries and fodd*. Department of Agricultura and

Fisheries for Scotland, UK.

- Maillar, D. & Picard D.F. (1987). Le régime alimentaire automnal et hivernal du chevreuil (*Capreolus capreolus*) dans une hêtraie calcicole déterminé par l'analyse des contenus stomacaux. *Gibier Faune Sauvage*, 4: 1-30.
- Maillard, D.; Boisaubert, B. & Gaillard, J.M. (1989). La masse corporelle: un bioindicateur possible pour le suivi des populations de chevreuils (*Capreolus capreolus* L.). *Gibier Faune Sauvage*, 6: 57-68 (in French).
- Marco, I.; Rosell, R.; Cabezón, O.; Beneria, M.; Mentaberre, G.; Casas E.; Hurtado A.; López-Olvera J.R. & Lavín S. (2009). Serologic and virologic investigations into pestivirus infection in wild and domestic ruminants in the Pyrenees (NE Spain). *Research in Veterinary Science*, 87: 149-153.
- Markina, F.A.; de Garnica Cortezo, R. & Sáez-Royuela, C. (2004). Physical development of wild boar in the Cantabric Mountains, Álava, Northern Spain. *Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos*, 16: 25-34.
- Marques, F. F. C. & Buckland, S. T. (2003). Incorporating covariates into standard line transect analyses. *Biometrics*, 59: 924-935.
- Marques, F. F. C.; Buckland, S. T.; Goffin, D.; Dixon, C. E.; Borchers, D. L.; Mayle, B. A. & Peace, A. J. (2001). Estimating deer abundance from line transect surveys of dung: sika deer in southern Scotland. *Journal of Applied Ecology*, 38: 349-363.
- Martin, R. D. (1990). *Primate origins and evolution: A phylogenetic reconstruction*. Chapman and May, London.
- Mateos, C. (2003). *Bienestar animal, sufrimiento y consciencia*. Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Mateos-Quesada, P. (1998). Parámetros poblacionales y sistema de apareamiento del corzo en las Villuercas. Ph.D. thesis, Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.
- Mateos-Quesada, P. (2002). *Biología y comportamiento del corzo ibérico*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Mateos-Quesada, P. (2005). Densidad poblacional y uso del espacio del corzo en el centro de la Península Ibérica. *Galemys*, 17: 3-12.

- Mateos-Quesada, P. (2011). Corzo (*Capreolus capreolus*). En: Salvador, A.; Cassinello, J. (eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Matson, G.M. (1981). *Workbook for cementum analysis*. Matson's Laboratory, Milltown, Montana.
- Matteri, R.L.; Carrol, J.A. & Dyer, C.J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg, G. P. And Mench, J. A. (eds.). *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*, 43-76. CABI Publishing, New York.
- Mattioli, L.; Capitani, C.; Avanzinelli, E.; Bertelli, I.; Gazzola, A. & Apollonio, M. (2004). Predation by wolves (*Canis lupus*) on roe deer (*Capreolus capreolus*) in north eastern Apennine, Italy. *Journal of Zoology*, 264: 249-258.
- Mazon, A.F.; Huising, M.O.; Taverne-Thiele, A.J.; Bastiaans, J. & Verburg-Van Kemenade, B.M.L. (2006). The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio*) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 27-37.
- Mcewen, B.S. & WINGFIELD, J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43: 2-15.
- Meriggi, A.; Sotti, F.; Lambert, P. & Gilio, N. (2008). A review of the methods for monitoring roe deer European populations with particular reference to Italy. *Hystrix*, 19: 103-120.
- Meunier, K. (1983). Das Spanisches Reh. In: Hofmann, R.R. & Rietschel, G. (eds.). *Wildbiologische Informationen für den Jäger*, 49-153. Jagd+Hege Ausbildungsbuch VI, Berlin.
- Meyling, A.; Houe, H. & Jensen, A.M. (1990). Epidemiology of bovine virus diarrhea virus. *Revue Scientifique et Technique de L'Office International des Epizooties*, 9: 75-93.
- Milinkovitch, M.C. (1992). DNA-DNA hybridizations support ungulate ancestry of Cetacea. *Journal of Evolutionary Biology*, 5: 149-160.
- Miller, G. S. (1912). *Catalogue of the mammals of western Europe*. British Museum, London.
- Miller, G.S. (1910). Descriptions of six new European mammals. *Annals and magazine of natural history*, 6: 458-461.
- Millsaugh, J.; Washburn, B.E.; Milanick, M.A. Beringer, J. Hansen, L.P. & Meyer, T.M. (2002).

- Noninvasive techniques for stress assessment in white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 30: 899–907.
- Misiewicz, J. (1994). Zarazenie jeleniowatych (*Cervidae*) nicieniami plucnymi w trzech regionach Polski. *Sylwan*, 1: 21-25.
- Montulet, J.P. (1984). *Les cervices du monde entier*. Le chevalier. Paris.
- Morales, G.A. & Pino, L.A. (1993). Biodiversity and similarity between the nematode parasite communities of domestic and wild ruminants. *Acta Científica Venezolana*, 44: 285-91.
- Morrondo, P.; Díaz, P.; Pedreira, J.; SánchezZ-Andrade, R. & Díez-Baños, P. (2005). Trematodosis prevalence in Rubia gallega cattle from different climatic areas. XIII Congreso Internazionale della Federazione Mediterranea Sanità e Produzione Ruminanti, Bari.
- Morrondo, P.; Vázquez, L.; Dacal, V.; Pato, F.J.; Cienfuegos, S.; Díaz, P.; López, C.; Panadero, R. & Díez-baños, P. (2009). *Comparative study of parasitic infections in roe deer (Capreolus capreolus) hunted in last decade in Galicia (NW Spain)*. 17th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, 59-60. International Congress, Perugia.
- Möstl, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23: 67–74.
- Möstl, E.; Maggs, J.L.; Schrötter, G.; Besenfelder, U. & Palme, R. (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary Research Communications*. 26: 127–139.
- Möstl, E.; Messmann, S.; Bagu, E.; Robia, C. & Palme, R. (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine*, A 46: 621–632.
- Munck, A.; Guyre, P. & Holbrook, N. (1984). Physiological functions of glucocorticoid in stress and their relation to pharmacological actions, *Endocrine Reviews*, 5: 25–48.
- Muñoz, P. M.; Boadella, M.; Arnal, M.; de Miguel, M. J.; Revilla, M.; Martínez, D. & Gortázar, C. (2010). Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC infectious diseases*, 10: 46.
- Mussa, P.P.; Aceto, P.; Abba, C. , Sterpone, L. & Meineri, G. (2003). Preliminary study on the feeding habits of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the western Alps. *Journal of Animal*

Physiology and Animal Nutrition, 87:105-108.

- Navarro-Castilla, Á.; Barja, I.; Olea, P.P.; Pineiro, A.; Mateo-Tomás, P.; Silván, G. & Illera, J. C. (2014). Are degraded habitats from agricultural crops associated with elevated faecal glucocorticoids in a wild population of common vole (*Microtus arvalis*)? *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 79: 36-43.
- Navarro-González, N.; Verheyden, H.; Hoste, H.; Cargnelutti, B.; Lourtet, B.; Merlet, J.; Daufresne, T.; Lavín, S.; Hewison, A.J.M.; Morand, S. & Serrano, E. (2011). Diet quality and immunocompetence influence parasite load of roe deer in a fragmented landscape. *European Journal of Wildlife Research*, 57: 639-645.
- Norvell, R. E.; Howe, F. P. & Parrish, J. R. (2003). A seven-year comparison of relative-abundance and distance sampling methods. *The Auk*, 120: 1013-1028.
- Oficina Nacional de Estadística. (2009). Censo Agrario 2009. Banco de datos municipal y Zonal, Comunidad de Madrid.
- Olde-Riekerink, R.G.M.; Dominici, A.; Barkema, H.W. & de Smit, A.J. (2005). Seroprevalence of pestivirus in four species of alpine wild ungulates in the High Valley of Susa, Italy. *Veterinary Microbiology*, 108: 297-303.
- Oleaga, A.; Balseiro, A. & Gortázar, C. (2008). Sarcoptic mange in two roe deer (*Capreolus capreolus*) from northern Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 54: 134-137.
- Omeragić, J.; Hodžić, A.; Zuko, A.; Jažić, A. (2011). Review of investigations of parasitofauna of wild animals in Bosnia and Herzegovina. *Veterinaria*, 60: 251-257.
- Padaiga, V.I. (1984). *Ecological principles of deer number control in the Lithuanian SSR*. Author's abstract of the dissert, for the degree of D. Sc. (Biology). Tartu.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids. Guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Science*, 1046: 1-6.
- Palme, R.; Robia, C.; Baumgartner, W. & Möstl, E. (2000). Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentrations. *Veterinary Record*, 146:108–109.
- Palomo, L.J.; Gisbert, J. y Blanco, J.C. (2007). *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Dirección General para la Conservación de la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid.

- Panadero, R.; Carrillo, E.B.; López, C.; Díez-Baños, N.; Díez-Baños, P. & Morondo, M.P. (2001). Bronchopulmonary helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the northwest of Spain.
- Veterinary Parasitology*, 99: 221-229.
- Panceira, A.M. (2012). Prevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por endoparásitos en rumiantes domésticos y silvestres de la provincia de Lugo. Ph.D. thesis, Universidad de Santiago de Compostela.
- Pasternak, F.A. (1955). Materials on the systematics and biology of the roe deer. *Learned Transactions of the Potemkin Moscow State Pedagogical Institute*, 38: 29-140.
- Pastoret, P.P.; Thiry, E.; Brochier, B.; Schwes, A.; Thomas, I. & Dubisson, J. (1988). Enfermedades de la fauna salvaje transmisibles a los animales domésticos. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 7: 737-771.
- Pato, F.J. (2011). Estudio epidemiológico de las infecciones que afectan al aparato respiratorio y gastrointestinal de los corzos en Galicia. Ph.D. thesis, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Pedroli, J. C.; Blant, M.; Chappuis, F. & Maire, J. A. (1981). La biologie du chevreuil *Capreolus capreolus* (L.) dans le canton de Neuchâtel. (Suisse). I. Recensement de la population: comparación de deux methodes. *Mammalia*, 45: 467-472.
- Pérez-Barbería, F.J.; Gordon, I.J. & Pagel, M. (2002). The origins of sexual dimorphism in body size in ungulates. *Evolution*, 56: 1276-1285.
- Pettorelli, N.; Gaillard, J.M.; Van Laere, G.; Duncan, P.; Kjellier, P.; Liberg, O. & Delorme, D.; Maillard, D.;(2002). Variations in adult body mass in roe deer: the effects of population density at birth and of habitat quality. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 7, 269: 747–753.
- Pfaff, D. W.; Phillips, M. I. & Rubin, R. T. (2004). *Principles of hormone/behavior relations*. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Pielowski, Z. (1970). *Sarna*. Warsaw: PWRIL, Warszawa.
- Piñeiro, A.; Barja, I.; Otero, G. P.; Silván, G. & Illera, J. C. (2015). No effects of habitat, prey abundance and competitor carnivore abundance on fecal cortisol metabolite levels in wildcats (*Felis silvestris*). *Annales Zoologici Fennici*, 52: 90-102.

- Pioz M.; Loison A.; Gauthier D.; Gibert P.; Jullien J.M.; Artois M. & Gilot-Fromont M. (2008). Diseases and reproductive success in a wild mammal: example in the alpine chamois. *Oecologia*, 155:691–704.
- Pocock, R.I. (1910). On the Specialized Cutaneous Glands of Ruminants. In: Proceedings of the Zoological Society of London, Vol. 80, No. 4: 840-845. Blackwell Publishing Ltd., London.
- Pollock, K. H. & Kendall, W. L. (1987). Visibility bias in aerial surveys: a review of estimation procedures. *Journal of Wildlife Management*, 51: 502-509.
- Prins, R.A. & Geelen, M. J. H. (1971). Rumen characteristics of red deer, fallow deer, and roe deer. *The journal of wildlife management*, 673-680.
- Prior, R. (1968). *The Roe Deer of Cranborne Chase. An Ecological Survey*. Oxford University Press. London.
- Prior, R. (1995). *The roe deer. Conservation of a native species*. Swan Hill Press, Shrewsbury. Proceedings of the Congress: Università degli Studi di Perugia, Perugia.
- Pritchard, J.K. & Wen, W. (2003). Documentation for STRUCTURE software: version 2. Available from: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>.
- Pryadko, E.I. (1972). On the systematic status of the Genus *Capreolus* in the light of helminthological data. *Zoologicheskii Zhurnal*, 51 (7) 1092-1093.
- Putnam, R. (1988). *The natural history of deer*. Comstock Publication Association, Cornell University Press, Ithaca.
- Quang, P. X. & Lanctot, R. B. (1991). A line transect model for aerial surveys. *Biometrics*, 47: 1089-1102.
- Radeloff, V. C.; Pidgeon, A. M. & Hostert, P. (1999): Habitat and population modelling of roe deer using an interactive geographic information system. *Ecological Modelling*, 114: 287–304.
- Randall, D.; Burggren, W. & French, K. (1998). *Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones*. Mc Graw Hill/Interamericana, Madrid.
- Randi, E.; Alves, P.; Carranza, J.; Milosevi-Zlatanovi, S. & Sfougaris, A. (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, 13: 3071–3083.

- Randi, E.; Pierpaoli, M. & Danilkin, A. (1998). Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*, 80: 429-437.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumincism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Raynaud, J. P. (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie humaine et comparée*, 45, 321-342.
- Refoyo, P. (2012). La cabra montesa (*Capra pyrenaica victoriae*) en el Parque Regional de la cuenca Alta del Manzanares (Sierra de Guadarrama). Proceso de reintroducción, parasitación y modelización del nicho ecológico a nivel regional y peninsular. Ph.D. thesis, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Reyes-Garcia, R.; Perez-de-la-Lastra, J.M.; Vicente, J.; Ruiz-Fons, F.; Garrido, J.M. & Gortázar, C. (2008). Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124: 75-81.
- Rivas-Martínez, S. (1987). Nociones sobre fitosociología, biogeografía y bioclimatología. En: Peinado M. y Rivas-Martínez S. (eds). *La vegetación de España*, 19-46. Servicio de publicaciones. Universidad Alcalá de Henares, Madrid.
- Rivas-Martínez, S. (1992). La Vegetación de la Sierra de Guadarrama. En: Sáenz de Miera, A., Comunidad de Madrid (eds.). *La Sierra de Guadarrama. Naturaleza, paisaje y aire de Madrid*, 167-195. Comunidad de Madrid, Madrid.
- Romero, L.M. & Wikelski, M. (2001). Corticosterone levels predict survival probabilities of Galapagos marine iguanas during El Nino events. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 7366-7370.
- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology & Evolution*, 19: 249-255.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Royo, L.J.; Pajares G.; Álvarez I.; Fernández I. & Goyache F. (2007). Genetic variability and differentiation in Spanish roe deer (*Capreolus capreolus*): A phylogeographic reassessment within the European framework. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 47-61.

- Ruiz-Fons, F.; Reyes-Garcia, A.R.; Alcaide, V. & Gortázar, C. (2008a). Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 951-953.
- Ruiz-Fons, F.; Rodriguez, O.; Torina, A.; Naranjo, V.; Gortázar, C. & de la Fuente, J. (2008b). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Veterinary Microbiology*, 126:282-286.
- Sadler, L. M. J.; Webbon, C. C.; Baker, P. & Harris, S. (2004). Methods of monitoring foxes (*Vulpes vulpes*) and badgers (*Meles meles*): are field signs the answer? *Mammal Review*, 34: 75-98.
- Sáez-Royuela, C. & Tellería, J.L. (1991). Roe deer (*Capreolus capreolus*) distribution in central Spain. *Folia Zoologica*, 40: 37-45.
- Sägesser, H. (1966). Über den Einfluß des Standortes auf das Gewicht des Rehwildes (*Capreolus c. capreolus*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 12: 54-62 (in German).
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sams, M.G.; Lochmiller, R.L.; Qualls, C.W. & Leslie, D.M. (1998). Sensitivity of condition indices to changing density in a white-tailed deer population. *Journal of Wildlife Diseases*, 34: 110-125.
- San José, C. (2006). Origen y carácter atávico de los caninos superiores en algunos corzos (*Capreolus capreolus*). A.C.E. <http://www.corzo.info/index.php>
- San José, C.; Braza, F.; Aragón, S. & Delibes, J.R. (1997). Habitat use by roe and red deer in Southern Spain. *Miscellanea Zoologica*, 20: 27-38.
- San Miguel, A. (2003). Gestión silvopastoral y conservación de especies y espacios protegidos. In: Robles A.B.; Ramos M.E.; Morales M.C.; Simón E.; González-Rebollar J.L. y Boza J. (Eds.). *Pastos, desarrollo y conservación*, 409-422. Junta de Andalucía, Granada.
- Sands, J. & Creel, S. (2004). Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal behaviour*, 67: 387-396.
- Sapolsky, R. (1992). Neuroendocrinology of the stress response, in: J.B. Becker, S.M. Breedlove, D. Crews (eds.). *Behavioral Endocrinology*, 287-324. MIT Press, Cambridge.
- Sapolsky, R.M. (1994). *Why zebras don't get ulcers: A guide to stress, stress-related diseases*,

- and coping*. WH Freeman, New York.
- Sapolsky, R.M.; Romero, L.M. & Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21: 55-89.
- Schatz, S. & Palme, R. (2001) Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a noninvasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications*, 25: 271-287.
- Schlosser, M. (1924). Tertiary vertebrates from Mongolia. *Paleontol. Sinica*, Ser.C. Peking.
- Schmidt, J. H.; Rattenbury, K. L.; Lawler, J. P. & Maccluskie, M. C. (2012). Using distance sampling and hierarchical models to improve estimates of Dall's sheep abundance. *The Journal of Wildlife Management*, 76: 317-327.
- Schneider, S.; Roessli, D. & Excoffier, L. (2000). Arlequin v.2.0: a software for population genetics data analysis. University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138: 32.
- Serrano, E. (2005). *Determinación de la edad del corzo (Capreolus capreolus) mediante la tinción de cemento dentario*. Informe inédito, Departamento Biología Animal, Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias Experimentales.
- Servicio de pesca continental, caza y parques nacionales (1968). Mapa Cinegético Nacional. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Shimalov, V.V. & Shimalov, V.T. (2003). Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, 89: 75-76.
- Shutler, D.; Mullie, A. & Clark, R. G. (2004). Tree swallow reproductive investment, stress, and parasites. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 442-448.
- Simpson, G. (1945) *The principles of classification and a classification of mammals*. Bulletin of the American Museum of Natural History. New York.
- Smart, J.C.R.; Ward, A.I. & White, P.C.I. (2004). Monitoring woodland deer populations in the U.K.: an imprecise science. *Mammalian Review*, 34: 99-114.
- Smith, B.L. (1998). Antler size and winter mortality of elk: effects of environment, birth year, and parasites. *Journal of Mammalogy*, 79, 1038-1044.

- Smith, V.H. Jones T.P. & Smith M.S. (2005). Host nutrition and infectious disease: an ecological view. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 3:268–274.
- Sober, E. (1984). *The nature of selection*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Sokolov, I.I. (1959). *Ungulates (the orders Perissodactyla and Artiodactyla). Fauna of the USSR. Mammals*. Nauka Publishers, Moscow-Leningrad
- Sommer, R.S. & Zachos, F.E. (2009). Fossil evidence and phylogeography of temperate species: 'glacial refugia' and post-glacial recolonization. *Journal of biogeography*, 36: 2013-2020.
- Soriguer, R.C. (1980). El conejo, *Oryctolagus cuniculus* (L), en Andalucía Occidental: Paramétros corporales y curva de crecimiento. *Doñana, Acta Vertebrata*, 7: 83-90.
- Southern, H.N. (1964). *The Handbook of British Mammals*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Staines, B.W. & Ratcliffe, P.R. (1987). Estimating the abundance of red deer (*Cervus elaphus* L.) and roe deer (*Capreolus capreolus* L.) and their current status in Great Britain. *Symposium of the Zoological Society in London*, 58: 131-152.
- Stallibrass, S. (1982). The use of cement layers for absolute ageing of mammalian teeth: a selective review of the literature, with suggestions for further studies and alternative applications. In: B. Wilson, C. Grigson, S. Payne (eds.). *Ageing and sexing animal bones from archeological sites*, 109-126. BAR British series. U.K.
- Stallknecht, D.E. (2007). Impediments to wildlife disease surveillance, research, and diagnostics. In: Childs J. E.; Mackenzie, J. S. & Richt, Jürgen A. (eds.). *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-species Transmission*, 315: 445-461. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.
- Stangl, W.G. & Marge, H. (1977). Rehwildstandserhebungen in einem Mittelwaldbetrieb in Weinviertel. *Mitt. Mitteilungen der Forstlichen Bundes-Versuchsanstalt Wien*, 122: 97-113.
- Stewart, P. M. (2003). The adrenal cortex. In: Larsen, P.R.; Kronenberg, H. M.; Melmed, S. and Polonsky, K.S. (eds.). *Williams Textbook of Endocrinology*, 491-551. Saunders, Philadelphia.
- Stoican, E. & Olteanu, G. (1959). Beitrage zum Studium der Helminthofauna des Rehes (*Capreolus*) in Rumänien. *Probleme der Parazitologie*, 7: 38-46.

- Stoner, C.J.; Caro, T.M. & Graham, C.M. (2003). Ecological and behavioral correlates of coloration in artiodactyls: systematic analyses of conventional hypotheses. *Behavioral Ecology*, 14: 823-840.
- Strandgaard, H. (1972). The roe deer (*Capreolus capreolus*) population at Kalo and the factors regulating its size. *Danish Review of Game Biology*. 7: 1-205.
- Sugar, L. (1991). Health status and parasitic infections in three Hungarian populations of roe deer. In: Bobek B.; et al. (eds). *Global trends in wildlife management*, 269–271. Trans. 18th IUGB Congress, Krakovia.
- Sugar, L. (1997). Deer and their parasites: disease or coexistence? *Parassitologia*, 39: 297-301.
- Swofford, D.L. (2003). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b 10. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P.; Fumagalli, L, Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.
- Taillon, J. & Cote, S.D. (2008). Are faecal hormone levels linked to winter progression, diet quality and social rank in young ungulates? An experiment with whitetaileddeer (*Odocoileus virginianus*) fawns. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 1591-1600.
- Tellería, J. L. (1986). *Manual para el censo de los vertebrados terrestres*. Editorial Raíces, Madrid.
- Tellería, J.L. (1987). Biogeografía de la avifauna nidificante en España Central. *Ardeola*, 34: 145-166.
- Tellería, J.L. (1999). La diversidad de vertebrados del Valle del Páular (Madrid). In: Comunidad de Madrid (ed.). *Primeras jornadas científicas del Parque Natural de Peñalara y del Valle de El Páular*, 155-162. Comunidad de Madrid.
- Tellería, J.L.; Virgós, E. (1997). Distribution of an increasing roe deer population in fragmented Mediterranean landscape. *Ecography*, 20: 247-252.
- Thomas, L.; Auckland, S.T.; Burnham, K.P.; Anderson, D.R.; Laake, J.L.; Borchers, D.L. & Strindberg, S. (2002). Distance sampling. In: El-Shaarawi, A. H. & Piegorsch, W. W. (eds.). *Encyclopaedia of environmetrics*, 544-552. John Wiley & Sons, Ltd.; Chichester.
- Thomas, L.; Laake, J.L.; Derry, J.F.; Buckland, S.T.; Borchers, D.L.; Anderson, D.R.; Burnham, K. P.; Strindberg, S.; Hedley, S.L.; Marques, F.F.C.; Pollard, J.H. & Fewster, R.M. (1998).

- Distance 3.5. Research Unit for Wildlife Population Assessment*. University of St. Andrews, UK.
- Tixier, H. & Duncan, P. (1996). Are European roe deer browsers? A review of variations in the composition of their diets. *Revue d'écologie-terre vie*, 51: 3–17.
- Tixier, H.; Duncan, P.; Scehovic, J.; Yani, A.; Gleizes, M. & Lila, M. (1997). Food selection by European roe deer: effects of plants chemistry and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology*, London, 242: 229-254.
- Toïgo, C.; Gaillard, J.M.; Van Laere, G.; Hewison, M. & Morellet, N. (2006). How does environmental variation influence body mass body size and body condition? Roe deer as a case study. *Ecography*, 29: 301–308.
- Tomanek, J. (1967). Contribution to knowledge of helminth fauna in roe deer of north Moravian region. *Veterinary Medicine*, 12: 739-744.
- Touma, C. & Palme, R. (2005) Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046: 54-74.
- Vázquez, L.; Pinceira, A.; Dacal, V.; Pato, F.J.; Panadero, R.; López, C.; Díaz, P.; Arias, M.S.; Francisco, I.; Díez-Baños, P. & Morrondo, P. (2010). Long-term study of internal parasitic infections in free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 69: 172-174.
- Verner, J. & Milne, K. A. (1989). Coping with sources of variability when monitoring population trends. *Annales Zoologici Fennici*, 26: 191-199.
- Verner, J. (1985). Assessment of counting techniques. *Current Ornithology*, 2: 247-302.
- Vernesi, C.; Pecchioli, E.; Caramelli, D.; Tiedermann, R.; Randi, E. & Bertorelle, G.; (2002). The genetic structure of natural and reintroduced roe deer (*Capreolus capreolus*) populations in the Alps and central Italy, with reference to the mitochondrial DNA phylogeography of Europe. *Molecular Ecology*, 11: 1285–1297.
- Vetyska, V. (1980). Endoparasites of roe deer in the Strakonice region. *Acta Veterinaria Bmo*, 48: 91-103.
- Vicente, J. & Gortázar, C. (2001). High prevalence of large spiny-tailed protostrongylid larvae in

- Iberian red deer. *Veterinary Parasitology*, 96: 165–170.
- Vincent, J.P.; Janeau, G. Quere, J.P. & Spitz, F. (1979). Distribution and activity rhythm of roe deer (*Capreolus capreolus*) in open forest. *Annales de Zoologie Ecologie Animale*, 11: 145-158.
- Von Lehmann, E. & Sägeser, H. (1986). *Capreolus capreolus* Linneus, 1758. In: J. Niethammer & F. Krapp (eds.). Handbuch der Säugetiere Europas. Band 2/II Paarhufer-Artiodactyla (*Suidae, Cervidae, Bovidae*), 233-268. Aula Verlag, Wiesbaden (in German).
- Walter, M. J. & Hone J. (2003). A comparasion of three aerial survey techniques to estimate wild horse abundance in the Australian Alps. *Wildlife Society Bulletin*, 31: 1138-1149.
- Wang, M. & Schreiber, A. (2001). Impact of the habitat fragmentation and social structure on the population genetics o roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in Central Europe. *Heredity*, 86: 703-715.
- Ward, A. I. White, P.C.L. & Critchley, C.H. (2004). Roe deer *Capreolus capreolus* behaviour affects density estimates from distance sampling surveys. *Mammalian Review*, 34: 315-319.
- Wasser, S. K.; Hunt, K. E.; Brown, J. L.; Cooper, K.; Crockett, C. M.; Bechert, U.; Millspaugh, J.J.; Larson, S. & Monfort, S. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of non domestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 120: 260-275.
- Wegge, P. & Storaas, T. (2009). Sampling tiger ungulate prey by the distance method: lessons learned in Bardia National Park, Nepal. *Animal Conservation*, 12: 78-84.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- White, G. (1974). Age determination of roe deer (*Capreolus capreolus*) from annual growth layers in the dental cementum, *Journal of Zoology*, 174: 511-516.
- White, G. C. (2005). Correcting wildlife counts using detection probabilities. *Wildlife Research*, 32: 211-216.
- Whitehead, G.K. (1964). *The deer of Great Britain and Ireland*. Routledge and Keegan Paul, London.
- Wiehler, J. & Tiedemann, R. (1998). Phylogeography of the European roe deer (*Capreolus*

- capreolus*) as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. *Acta Theriologica*, 5: 187-197.
- Wikelski, M. & Cooke, S.J. (2006) Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 38-46.
- Wingfield, J.C. (2008). Comparative endocrinology, environment and global change. *General and Comparative Endocrinology*, 157: 207-216.
- Witmer, G.W. (2005). Wildlife population monitoring: some practical considerations. *Wildlife Research*, 32: 259-263.
- Young, K.M.; Walker, S.L.; Lanthier, C.; Waddell, W.T.; Monfort, S.L. & Brown, J.L. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology*, 137: 148–165.
- Zejda, J. & Bauerova, Z. (1985). Homes ranges of field roe deer. *Acta Societatis Scientiarum Naturalium. Brno*, 19: 1-43.
- Zwijacz-Kozica, T.; Selva, N.; Barja, I.; Silván, G.; Martínez-Fernández, L.; Illera, J. C. & Jodłowski, M. (2013). Concentration of fecal cortisol metabolites in chamois in relation to tourist pressure in Tatra National Park (South Poland). *Acta theriologica*, 58: 215-222.

ANEXO

